

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



*Bakalářská práce*

**Vápníková signalizace u astrocytů  
ve fyziologických a patologických podmínkách**

**Calcium signalling in astrocytes  
under physiological and pathological conditions**

**Petra Svatoňová**

Školitelka: Ing. Miroslava Anděrová, CSc.

Praha, 2015

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14.08.2015

Podpis

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala své školitelce Ing. Miroslavě Anděrové, CSc. za ochotu, trpělivost a cenné rady, kterými mi při vypracování bakalářské práce pomohla.

# Abstrakt

Vápníková signalizace představuje klíčovou komponentu, která umožňuje astrocytům zajišťovat fyziologické fungování neuronů. Změny v signalizaci  $\text{Ca}^{2+}$  a následné zvýšení intracelulárních hladin vápníku provází celou řadu patologických stavů centrálního nervového systému, jako jsou traumatická či ischemická poškození mozku a míchy, epilepsie či neurodegenerativní onemocnění, například Alzheimerova choroba, a psychiatrická onemocnění, například schizofrenie. Výzkum zaměřený na objasnění mechanismů vápníkové signalizace u astrocytů, molekulárních komponent, které se jí účastní a na možnosti regulace vápníkové signalizace tak může přinést nové poznatky významné z terapeutického hlediska.

**Klíčová slova:** astrocyty, vápníková signalizace, iontové kanály, ionotropní a metabotropní receptory, endoplasmatické retikulum

# Abstract

Calcium signalling in astrocytes represents an important component, which enables proper neuronal functioning under physiological conditions. Alterations in  $\text{Ca}^{2+}$  signalling, accompanied by an increase in intracellular calcium levels is a hallmark for numerous pathological states of central nervous system, such as traumatic and ischemic brain/spinal cord injuries, epilepsy as well as neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease and psychiatric disorders, such as schizophrenia. The research analyzing the molecular components of astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  signalling can help us understand the control mechanisms used in calcium signalling and thus be greatly beneficial for further therapeutic research.

**Key words:** astrocytes, calcium signalling, ion channels, ionotropic and metabotropic receptors, endoplasmatic reticulum

## Seznam použitých zkratk

<b>2APB</b>	2-aminoethylester difenylborité	kyseliny	<b>CICR</b>	Ca <sup>2+</sup> vyvolané uvolnění Ca <sup>2+</sup> (angl. Calcium-Induced Calcium Release)
<b>Aβ</b>	β-amyloid		<b>Cl<sup>-</sup></b>	chloridové ionty
<b>AD</b>	Alzheimerova choroba (angl. Alzheimer's Disease)		<b>CNS</b>	centrální nervová soustava
<b>ALS</b>	Amyotrofická laterální skleróza		<b>CRAC</b>	vápenatý kanál aktivovaný uvolněním Ca <sup>2+</sup> z ER(angl. Ca <sup>2+</sup> -Release-Activated Ca <sup>2+</sup> Channel)
<b>AMPA</b>	kyselina α-amino-3-hydroxy-5-methyl- 4-isoxazolepropionová		<b>CsA</b>	cyklosporin A
<b>AP</b>	akční potenciál		<b>DAG</b>	diacylglycerol
<b>ATP</b>	adenosin trifosfát		<b>ECS</b>	mimobuněčný prostor (angl. Extracellular Space)
<b>Ba<sup>2+</sup></b>	barnaté ionty		<b>EGFP</b>	zelený fluorescenční protein se zvýšenou expresí (angl. Enhanced Green Fluorescent Protein)
<b>BBB</b>	hematoencefalická bariéra (angl. Blood-Brain Barrier)		<b>ER</b>	endoplazmatické retikulum
<b>CA</b>	Cornu Ammonis		<b>GABA</b>	kyselina γ-aminomáselná (angl. Gamma-aminobutyric acid)
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	vápenaté ionty		<b>GFAP</b>	gliální fibrilární acidický protein (angl. Glial Fibrillary Acidic Protein)
<b>Cd<sup>2+</sup></b>	kademnaté ionty		<b>GFP</b>	zelený fluorescenční protein (angl. Green Flurescent Protein)
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>e</sub></b>	mimobuněčná koncentrace vápenatých kationtů (angl. Extracellular Calcium Concentration)		<b>Glu</b>	glutamát
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b>	vnitrobuněčná koncentrace vápenatých kationtů (angl. Intracellular Calcium Concentration)		<b>GluR</b>	glutamátový receptor
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>L</sub></b>	koncentrace vápníku v lumen ER (angl. Lumenal Calcium Concentration)		<b>GPCRs</b>	s G-proteiny spřažené receptory (angl. G Protein-coupled Receptors)
<b>CaM</b>	kalmodulin (angl. Calmodulin)		<b>GSH</b>	glutathion
<b>CaMKII</b>	na vápníku/kalmodulinu závislá protein kináza II (angl. Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II)		<b>hGFAP</b>	lidský gliální fibrilární acidický protein (angl. Human Glial Fibrillary Acidic Protein)
<b>CBP</b>	Ca <sup>2+</sup> vazebný protein (angl. Ca <sup>2+</sup> Binding Protein)		<b>ICRAC</b>	proud aktivovaný uvolněním Ca <sup>2+</sup> z ER
<b>CCE</b>	kapacitní Ca <sup>2+</sup> vstup (angl. Capacitative Calcium Entry),		<b>IL-1β</b>	interleukin 1β
			<b>IP<sub>3</sub></b>	inositol-1,4,5-trifosfát
			<b>IP<sub>3</sub>Rs</b>	inositol-1,4,5-trifosfátové receptory

<b>K<sup>+</sup></b>	ionty draslíku	<b>RTK</b>	tyrosin-kinázový receptor (angl. Receptor Tyrosine Kinase)
<b>Kir</b>	dovnitř usměrněný napěťově závislý K <sup>+</sup> kanál (angl. Inwardly Rectifying Potassium Channels)	<b>RT-PCR</b>	reverzní transkripční polymerázová řetězová reakce (angl. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)
<b>LGCaC</b>	ligandem ovládaný vápníkový kanál (angl. Ligand-gated Calcium Channel)	<b>Ru360</b>	Ruthenium 360
<b>mGluR5</b>	metabotropní glutamátový receptor typu 5	<b>Ry</b>	ryanodin
<b>MPTP</b>	mitochondriální pór (angl. Mitochondrial Permeability Transition Pore)	<b>RyRs</b>	ryanodinové receptory
<b>Na<sup>+</sup></b>	ionty sodíku	<b>S100β</b>	β-podjednotka Ca <sup>2+</sup> vázajícího proteinu
<b>nAChRs</b>	nikotinové acetylcholinové receptory (angl. Nicotinic Acetylcholine Receptors)	<b>SERCA</b>	membránová ATPázová ER pumpa (angl. Smooth Endoplasmic Reticular Ca <sup>2+</sup> ATPase)
<b>NCKX</b>	Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> -K <sup>+</sup> výměník	<b>SNARE</b>	protein vezikulárního transportu (angl. SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) Receptor)
<b>NCX</b>	Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> výměník	<b>SOCE</b>	mechanismus vstupu Ca <sup>2+</sup> (angl. Store-Operated Ca <sup>2+</sup> Entry)
<b>NMDAR</b>	N-methyl-D-aspartátový receptor	<b>SOCs</b>	kanály ovládané ER (angl. Store-Operated Channels)
<b>Orail</b>	lidský homolog <i>olf186-F</i> protein	<b>SOD1</b>	superoxid dismutáza
<b>P<sub>2</sub>X</b>	ionotropní purinoreceptory	<b>STIM 1</b>	protein vnímající [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>L</sub> (angl. Stimal Interaction Molecule)
<b>P<sub>2</sub>Y</b>	metabotropní purinoreceptory	<b>TNF-α</b>	faktor nádorové nekrózy alfa (angl. Tumor Necrosis Faktor Alpha)
<b>PIP<sub>2</sub></b>	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát	<b>TRP kanály</b>	iontové kanály propustné pro Ca <sup>2+</sup> /Na <sup>+</sup> (angl. Transient Receptor Potential)
<b>PLC</b>	fosfolipáza C	<b>VGCC</b>	napětím ovládaný vápníkový kanál (angl. Voltage-gated Calcium-selective Channel)
<b>PM</b>	plazmatická membrána		
<b>PMCA</b>	ATPázová pumpa plazmatické membrány (angl. Plasma Membrane Ca <sup>2+</sup> ATPase)		
<b>ROS</b>	kyslíkové radikály (angl. Reactive Oxygen Species)		

# Obsah

1	Úvod.....	1
2	Astrocyty .....	2
2.1	Zařazení astrocytů v rámci gliových buněk .....	2
2.2	Morfologie astrocytů .....	3
2.3	Identifikace astrocytů.....	5
2.4	Funkce astrocytů.....	6
3	Vápníková signalizace .....	8
3.1	Principy vápníkové signalizace.....	8
3.1.1	Vstup vápníku do buňky .....	9
3.1.2	Tok vápníku z buňky .....	10
3.2	Vápníková signalizace u astrocytů.....	11
3.2.1	Úloha ER ve vápníkové signalizaci u astrocytů .....	12
3.2.2	Úloha extracelulárního vápníku v signalizaci u astrocytů .....	13
3.2.3	Úloha mitochondrií ve vápníkové signalizaci u astrocytů .....	16
4	Vápníková signalizace u astrocytů v patologických stavech.....	17
4.1.1	Nadměrná vzrušivost neuronů.....	17
4.1.2	Zánětlivá odpověď .....	19
4.1.3	Produkce kyslíkových radikálů .....	19
5	Závěr .....	20
6	Seznam citované literatury.....	21



# 1 ÚVOD

Povědomí o gliových buňkách jako o pasivních podpůrcích neuronů vzalo za své v první polovině 90. let i díky objevu aktivní role astrocytů v modulaci neuronálních funkcí (Nedergaard, 1994). Poslední dvě desetiletí se začíná neurobiologický výzkum přesouvat ze studia čistě neuronů na interakce neuronů a glií. Patologické stavy původně popisované jako neuropatologie se s postupujícím výzkumem jeví primárně jako gliopatie. Glie se začínají dostávat do centra pozornosti výzkumných týmů pro svůj terapeutický potenciál. Cílení terapeutických přístupů na gliové buňky, které významně ovlivňují fungování neuronů, může přinést nové efektivní možnosti. Především výzkum gliových buněk a jejich interakcí s neurony je tedy klíčový.

Mechanismy vzájemné komunikace astrocytů s neurony závisí na vápníku, který je hlavním signalizačním iontem. Vysoká vnitrobuněčná koncentrace vápníku je pro buňku toxická, způsobuje shlukování proteinů a nukleových kyselin, ovlivňuje celistvost lipidové membrány a vyvolává srážení fosfátů (Case *et al.*, 2007). Z těchto důvodů je nutná jeho přesná regulace, kterou buňka využívá k signalizaci. Narušení mechanismů zajišťujících homeostázu vápníku vyvolává nebo posiluje patologické stavy.

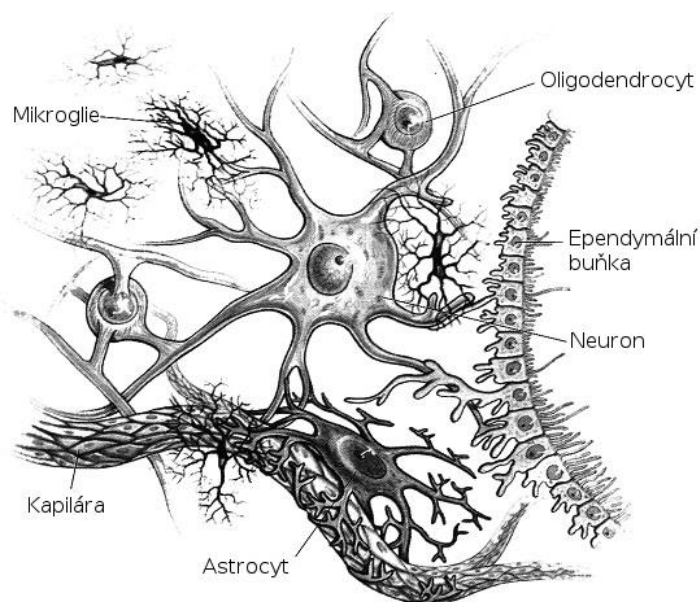
Cílem této bakalářské práce je poskytnout přehled o dosud známých mechanismech vápníkové signalizace u astrocytů a to jak za fyziologických podmínek, tak i patologických stavů. Tyto patologické stavy představují převážně různá neurodegenerativní onemocnění jako je Alzheimerova demence (AD), Parkinsonova choroba, Amyotrofická laterální skleróza (ALS), Ischemie a Epilepsie a psychiatrické poruchy. První část této práce si klade za cíl uvést do problematiky astrocytů z hlediska jejich morfologie, identifikace a funkcí. Následně jsou popsány mechanismy vápníkové signalizace, které jsou dále rozebrány s ohledem na astrocyty. V poslední části práce je řešena role vápníkové signalizace u astrocytů ve vybraných patologických stavech centrálního nervového systému.

## 2 ASTROCYTY

Astrocyty jsou nejpočetnější a nejrozmanitější skupinou gliových buněk mozku a svým počtem významně převyšují neurony. Na rozdíl od neuronů se jedná o elektricky nevzrušivé buňky, které ovšem exprimují, stejně jako neurony, různorodé membránové transportéry, iontové kanály a receptory, což podmiňuje jejich fungování v rámci centrální nervové soustavy (CNS).

### 2.1 ZAŘAZENÍ ASTROCYTŮ V RÁMCI GLIOVÝCH BUNĚK

Gliové buňky lze rozdělit podle původu ektodermálního nebo mezodermálního na makroglie a mikroglie. Astrocyty reprezentují gliové buňky ektodermálního původu a patří, společně s oligodendrocyty a ependymálními buňkami, do skupiny makroglie CNS, zatímco mikroglie jsou původu mezodermálního (Obr. 1).



Obr. 1: Gliové buňky v CNS. Astrocyty kontrolují homeostázu CNS na několika úrovních – metabolické, molekulární, buněčné, orgánové, morfologické a obranné. Oligodendrocyty myelinizují axony. Mikroglie hrají roli v imunitní obraně CNS. Ependymální buňky tvoří buněčnou vrstvu oddělující cerebrospinální tekutinu od buněčných kompartmentů. (Upraveno dle Ilie [online], 2012)

Mikroglie se významně podílí na imunokompetentní obraně mozku a u neuronů zastávají regenerační a podpůrné funkce (Streit, 2002).

Oligodendrocyty produkují myelin a izolují axony v CNS, čímž umožňují rychlé saltatorní šíření akčního potenciálu (AP). Gibson a spoluautoři (2014) ve své studii ukazují vliv neuronální aktivity na myelinizaci v dospělém mozku.

Ependymální buňky tvoří funkční epitel, vystylající stěny mozkových komor a míšního kanálu, kde zastávají funkci podpůrnou a ochrannou a podílí se na tvorbě mozkomíšního moku. Ependymální buňky se účastní formování buněčné vrstvy, oddělující cerebrospinální tekutinu od buněčných kompartmentů CNS a hrají klíčovou úlohu ve vývoji CNS (Jiménez *et al.*, 2014).

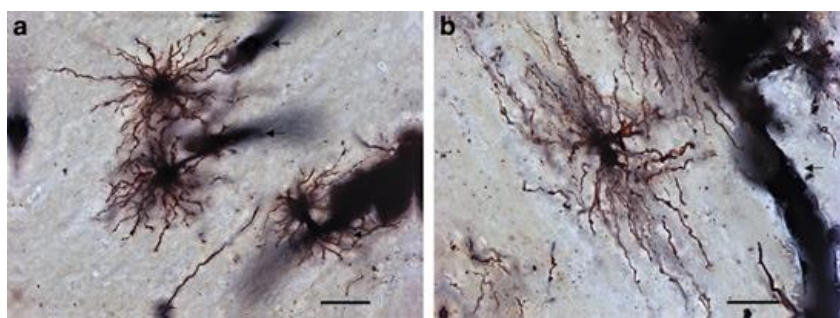
NG2 gliové buňky neboli polydendrocyty exprimují, jak jejich název napovídá, NG2 chondroitin sulfát proteoglykanu. Tyto glie dávají vzniknout oligodendrocytům a protoplazmatickým astrocytům (Zhu *et al.*, 2008). Kromě důležitých rolí ve vývoji CNS zastávají polydendrocyty i významné úlohy v dospělém mozku, jako je například pomoc v obnovení myelinu diferenciací

v oligodendrocyty, které produkují myelin v oblastech postižených demyelinizací (Watanabe *et al.*, 2002).

## 2.2 MORFOLOGIE ASTROCYTŮ

Označení pro astrocyty pochází z latinských slov *astra* – hvězda a *cyte* – buňka, kdy latinské označení pro buňku je odvozeno z řeckého slova *kytos* – trup. Ve skutečnosti je pouze zlomek astrocytů hvězdicovitěho tvaru. Astrocyty jsou velmi různorodou skupinou nejen z hlediska morfologie, ale lze je zároveň rozlišit i na základě oblastí v CNS, fyziologie a funkcí, které zastávají (Kimelberg & Nedergaard, 2010; Matyash & Kettenmann, 2010).

Dle morfologie lze rozdělit dospělé astrocyty do dvou hlavních skupin. Do první patří dvě formy astrocytů hvězdicovitěho tvaru, které se liší morfologií výběžků – protoplazmatické astrocyty šedé hmoty mozku s mnoha hustě větvenými výběžky, které obklopují tělo astrocytu, a vláknité astrocyty bílé hmoty s delšími řidčeji větvenými výběžky (Obr. 2).



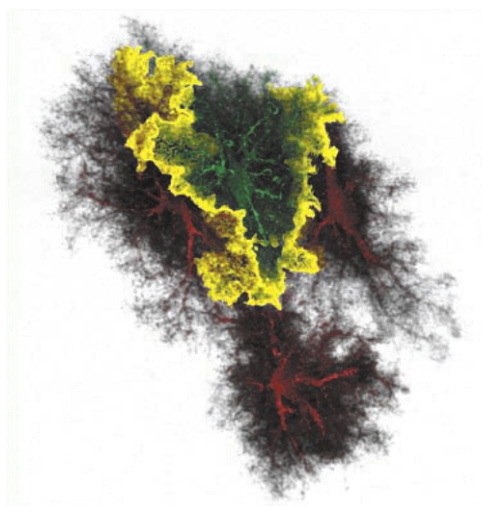
Obr. 2: Morfologie protoplazmatických (vlevo) a vláknitých astrocytů (vpravo). (Torres-Platas *et al.*, 2011)

Druhá skupina je zastoupena protáhlými buňkami Bergmannových glií mozečku a Müllerových buněk sítnice. Toto klasické dělení je založeno na prvních neurohistologických metodách (Kimelberg, 2010).

Na základě moderních metod značení lze v současné době rozdělit astrocyty do dalších skupin. Jedním z příkladů je dělení dle Emsleyho & Macklise (2006), kteří na základě tří komplementárních metod značení rozdělili astrocyty u transgenických myší do devíti skupin a to na tanycyty, radiální glie, Bergmannovy glie, protoplazmatické astrocyty, vláknité astrocyty, velate glie, marginální glie, perivaskulární glie a ependymální glie. K značení využili imunobarvení protilátkou, která rozeznává gliální fibrilární acidický protein (GFAP z angl. Glial Fibrillary Acidic Protein), beta-podjednotku kalcium vázajícího proteinu S100 $\beta$  v kombinaci s expresí zeleného fluorescenčního proteinu (GFP z angl. Green Fluorescent Protein) pod lidským promotorem pro GFAP u transgenických myší (hGFAP-GFP exprese; hGFAP z angl. Human Glial Fibrillary Acidic Protein).

Primární výběžky protoplazmatických astrocytů se extrémně rozvětvují v krátké výběžky, které se nebarví klasickými barvicími technikami, mezi které patří například imunohistochemické barvení pomocí protilátek proti GFAP (Bushong *et al.*, 2002). Hirrlinger a spoluautoři (2004) pozorovali

na řezech mozkového kmene transgenních myší exprimujících zelený fluorescenční protein (EGFP z angl. Enhanced Green Fluorescent Protein) pod kontrolou lidského GFAP promotoru dva typy těchto výběžků, které se od sebe strukturálně lišily hlavně v místech kontaktu se synapsemi neuronů. Astrocyty vysílají své výběžky do prostoru synapsí neuronů a díky schopnosti vychytávat neuropřenašeče aktivně regulují přenos informace mezi neurony. Výběžky vstupují do prostoru okolo neuronu ve dvou morfologických podobách a to ve formě výčnělků membrány lamelipodidního tvaru, nebo tvoří dlouhé protáhlé kontraktilní výběžky podobné filopodiím (Hirrlinger *et al.*, 2004). Výběžky vláknitých astrocytů jsou řidčeji větvené, tím umožňují větší přesahy výběžků jednoho astrocytu do výběžků druhého a nelze rozeznat teritoriální domény na rozdíl od protoplazmatických astrocytů. U nich se husté



větvení sousedních buněk překrývá pouze na okrajích jednotlivých teritoriálních domén, které rozlišil Bushong *et al.* (2002). (Obr. 3).

Obr. 3: 3D vizualizace překrytí okrajových výběžků sousedních domén protoplazmatických astrocytů. Na obrázku je žlutě označená hranice teritoriální domény zeleně značené buňky astrocytu. Hranice je tvořena přesahy výběžků sousedních červeně značených buněk do výběžků zeleně značené buňky astrocytu. (Bushong *et al.*, 2002)

Protoplazmatické astrocyty se morfologicky liší mezi sebou nejen v závislosti na výskytu v různých částech mozku, ale i v rámci stejné oblasti. V CA1 oblasti hipokampu se nachází tvarově rozdílné subpopulace protoplazmatických astrocytů protáhlého, kulovitého a vřetonovitého tvaru (Bushong *et al.*, 2002).

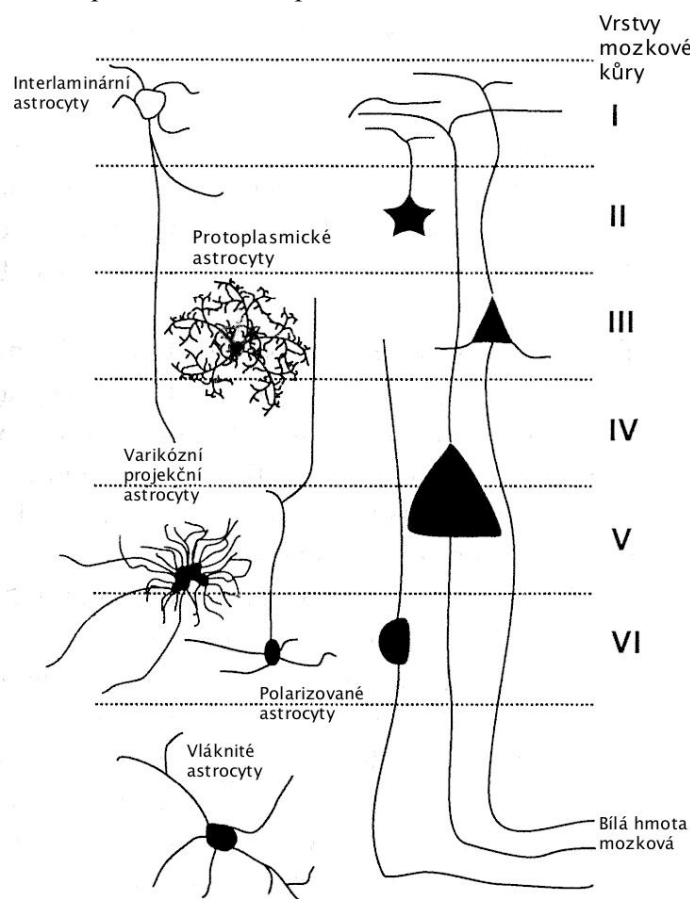
Morfologicky zajímavou subpopulací protoplazmatických astrocytů z hlediska typů výběžků jsou s povrchem spojené astrocyty (angl. Surface-associated Astrocytes), které jak jejich název napovídá, asociují svými buněčnými těly s korovým povrchem v zadní části přední kůry mozkové a v kůře amygdaly. Výběžky lze rozlišit na povrchové, které obklopují cévy *pia mater* a sestupné nacházející se v I. vrstvě mozkové kůry (Feig & Haberly, 2011).

Oberheim a spoluautoři (2009) popisují typ GFAP pozitivních protoplazmatických astrocytů prokázaný zatím pouze v lidském mozku a obdobný morfologický typ v mozku vyšších primátů. Nazývají je varikózní projekční astrocyty (angl. Varicose projection astrocytes; Obr. 4) právě pro jejich dlouhé výběžky s charakteristickým zvětšováním objemu výběžků v celé délce. Přesná funkce těchto výběžků, stejně jako buněk samotných není známa a je předmětem dalšího výzkumu.

Další morfologicky specifické typy astrocytů jsou interlaminární a polarizované astrocyty (Obr. 4). Interlaminární astrocyty se nachází v mozkové kůře vyšších primátů a člověka. Výběžky jednotlivých interlaminárních astrocytů se ubíhají do hlubších vrstev mozkové kůry paralelně vedle sebe a ohraničují tak sloupcové oblasti napříč vrstvami mozkové kůry zvané palisády. Funkce těchto buněk

může souviset právě s tvorbou palisád, zatím ale není žádná funkce prokázána. (Colombo & Reisin, 2004)

Při morfologickém srovnání astrocytů odpovídajících typů nacházejících se ve stejných částech mozku u zástupců vyšších a nižších primátů, hlodavců a člověka bylo zjištěno, že astrocyty mozkové kůry člověka jsou několikanásobně větší a mají více primárních výběžků, než bylo pozorováno u zástupců ostatních skupin (Oberheim *et al.*, 2009).



**Obr. 4: Morfologické podtypy astrocytů v mozku primátů.** Výběžky vláknitých astrocytů dosahují délky do 300  $\mu\text{m}$  a jejich těla jsou vymezena mezi svazky axonů. Protoplasmatické astrocyty u hlodavců obsahují 5-10 primárních výběžků v průměru 50  $\mu\text{m}$  dlouhých, které se extrémně rozvětvují. Buněčná těla interlaminárních astrocytů vysílají jeden nebo dva až 1 mm dlouhé nevětvené výběžky do III. až V. korové vrstvy. Polarizované astrocyty jsou lokalizovány v hlubokých korových vrstvách blízko bílé hmoty a vysílají jeden či dva výběžky do vrstev vrchnějších. Těla buněk varikózních astrocytů leží na pomezí V. a VI. vrstvy mozkové kůry a vysílají rovné nevětvené výběžky do hlubších korových vrstev. (Upraveno dle Verkhratsky & Butt, 2013)

## 2.3 IDENTIFIKACE ASTROCYTŮ

Jak je patrné z heterogenity jednotlivých typů astrocytů, které se liší od sebe svým tvarem, počtem a větvením výběžků, lokalizací v CNS, funkcemi, definování jednotných identifikačních kritérií astrocytů je velmi obtížné (Wang & Bordey, 2008). Kimelberg (2009) definuje kritéria pro identifikaci astrocytů následovně: Astrocyty nemohou na rozdíl od neuronů generovat AP a jsou tedy elektricky nevzrušivé, disponují ale vysoce záporným membránovým potenciálem (-80 až -90 mV). Astrocyty obsahují GFAP a glykogen, jsou schopné exprimovat transportéry pro kyselinu  $\gamma$ -aminomáselnou (GABA z angl. Gamma-aminobutyric acid) a glutamát (Glu), vysílají výběžky k cévám a k prostoru synaptické štěrby a spojují se s okolními astrocyty pomocí mezerových spojů.

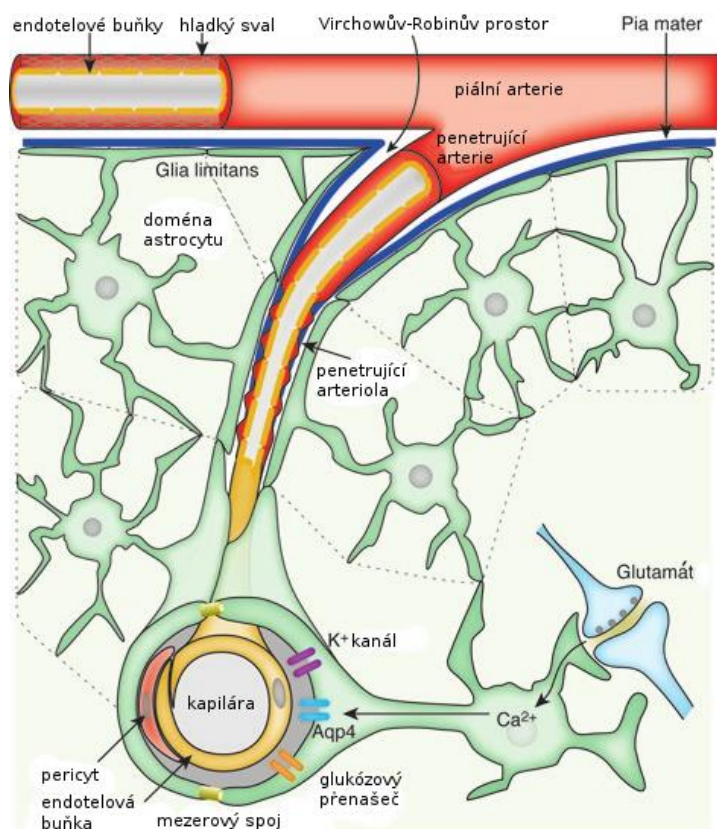
## 2.4 FUNKCE ASTROCYTŮ

Mezi nejdůležitější funkce astrocytů patří vychytávání a kontrola distribuce iontů a vody, směřující k zajištění homeostázy, metabolismus glukózy a výživa neuronů laktátem, komunikace a interakce s nervovými buňkami, jejich podpora, synchronizace a vychytávání neuropřenašečů, především Glu ze synaptické štěrbin. Astrocyty exprimují receptory pro neuropřenašeče a odpovídají na neuronální aktivitu zvýšením intracelulárních hladin vápenatých iontů a zpětnou signalizací neuronům (Heuser *et al.*, 2014).

Astrocyty zajišťují řadu funkcí, které jsou klíčové pro správné fungování CNS. Spolu s fakty, že se jedná o nejpočetnější buňky mozku a jejich rozmístění musí zajistit především kontakt s neuronálními těly a jejich dendrity (Halassa *et al.*, 2007a), synapsemi a krevním řečištěm (Oberheim *et al.*, 2009; Obr. 5), astrocyty hrají důležitou strukturní a integrační roli jak v dospělém mozku, tak již během jeho vývoje (Kriegstein & Alvarez-builla, 2009). Určují mikroarchitekturu šedé hmoty mozkové tím, že vytváří strukturní a funkční nepřekrývající se domény (Bushong *et al.*, 2002; Halassa *et al.*, 2007a; Oberheim *et al.*, 2009), hrají také důležitou roli v synaptogenezi a dospívání synapsí (Ullian *et al.*, 2001).

Astrocyty zajišťují kontakt s kapilárami vstupujícími do mozku (Oberheim *et al.*, 2009), od kterých nejen čerpají potřebné živiny a odvádí metabolity (Magistretti, 2009), ale i řídí lokální průtok krve (Takano *et al.*, 2006) a zajišťují i ochrannou bariéru mezi krevním řečištěm a prostředím mozku (BBB z angl. Blood-Brain Barrier), která zabraňuje průniku velkých molekul z krve do mozku. Astrocyty zakončeními svých výběžků obalují souvisle cévy v CNS a právě toto spojení stěn cév se

zakončeními výběžků astrocytu tvoří funkční bariéru (Mathiisen *et al.*, 2010; Obr. 5)



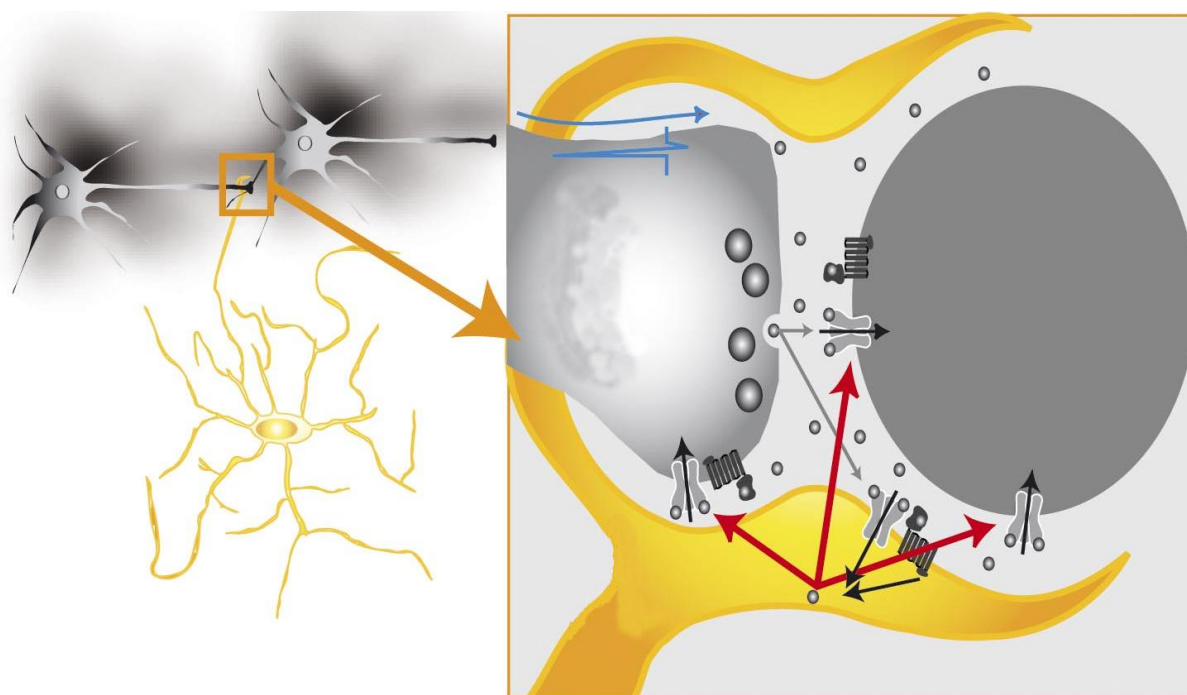
Obr. 5: Neuron-cévní propojení zajištěné astrocyty. Astrocyty jsou v kontaktu se synapsemi i krevním řečištěm, obalují penetrující arterioly zakončeními svých výběžků a tvoří s nimi funkční BBB. Zakončení výběžků astrocytů exprimují iontové kanály a specializované proteiny, které zajišťují transport glukózy (glukózový přenašeč), vody (aquaporin 4) a odvádí metabolity. Glukóza jako nezbytný energetický substrát pro neurony, zajišťující synaptický přenos je rychle dodávána dendritům. Kontakty mezi jednotlivými astrocyty a jejich doménami zajišťují mezerové spoje. (Upraveno dle Iadecola & Nedergaard, 2007)



Astrocyty reagují na zvýšenou synaptickou aktivitu, doprovázenou uvolněním Glu, transportem glukózy, kterou ukládají ve formě glykogenu a syntézou laktátu, který v případě energetické potřeby transportují do neuronů (Magistretti, 2009).

Při šíření AP po membráně neuronů dochází k hromadění draselných iontů ( $K^+$ ) v extracelulárním prostoru (ECS z angl. Extracellular Space). Astrocyty zajišťují rovnoměrné rozmístění  $K^+$  z míst, kde je ho nadbytek do míst, kde je jeho koncentrace naopak nízká. To se děje jednak díky pasivní difuzi a mezerovým spojům, ale hlavně prostřednictvím iontových přenašečů a kanálů přítomných v membráně astrocytů. Mezi nejdůležitější patří dovnitř usměrněné napětově závislé  $K^+$  kanály (Kir z angl. Inwardly Rectifying Potassium Channels),  $Na^+/K^+$  ATPázové pumpy a  $Na^+/K^+-Cl^-$  kotransport (Kofuji & Newman, 2004). Vychytávání  $K^+$  astrocyty je důležité, protože jeho přílišné nahromadění v mimobuněčném prostoru po delší dobu způsobuje depolarizaci neuronů, vtok vápníku do neuronů, hypervzrušivost a následné odumírání neuronů. Vysoká koncentrace  $K^+$  v prostředí mimo buňku je typická i v patologických stavech jako je ischemie (Leis *et al.*, 2005).

Astrocyty upravují synaptické funkce díky formování tripartitní synapse, kde výběžek astrocytu obklopuje synaptickou štěrbinu – prostor mezi presynaptickým zakončením neuronu a postsynaptickou membránou. Tripartitní synapse buňce astrocytu dovoluje vychytávání neuropřenašečů ze synaptické štěrbiny, čímž je synapse připravena na další přenos informací. Kromě toho astrocyt přijímá ve formě neuropřenašečů informace o neuronální aktivitě a odpovídá na ně uvolněním gliotransmiterů a tak koordinuje neuronální aktivitu. (Araque *et al.*, 1999; Obr. 6)



**Obr. 6: Tripartitní synapse.** Astrocyty exprimují receptory pro neurotransmitery, po jejichž aktivaci dochází ke zvýšení  $[Ca^{2+}]_i$  a uvolnění gliotransmiterů, které se váží na receptory v membráně neuronů a modulují další synaptický přenos. (Upraveno dle Theodosis *et al.*, 2008)

### 3 VÁPŇÍKOVÁ SIGNALIZACE

Vápníkové ionty ( $\text{Ca}^{2+}$ ) jsou pravděpodobně nejvšestranějším buněčným poslem, který byl dosud objeven. Je zahrnut v regulaci téměř všech známých buněčných funkcí a reakcí jako jsou oplození, proliferace, vývoj, metabolismus, učení a paměť, kontrakce a sekrece. Řízení těchto procesů musí být velice přesné s ohledem na toxicitu  $\text{Ca}^{2+}$ , kdy překročení jeho fyziologických hladin může vést k řízené buněčné smrti či nekróze (Berridge *et al.*, 2000).

Vápníkem je zprostředkován přenos signálu, který hraje úlohu v neuronální vzrušivosti a synaptickém přenosu (Clapham, 2007).  $\text{Ca}^{2+}$  hrají také důležitou roli v řízení genové exprese. Vápník nejen zastává široké pole působnosti s ohledem na odlišné funkce, které řídí, ale i po stránce možnosti vazby na různorodé receptory a další molekulární komponenty a proteiny s různou specifitou a afinitou a schopnosti autoregulace na různých stupních signalizace. Nejširší povědomí o  $\text{Ca}^{2+}$  existuje jako o druhém poslovi. Vápník může signalizaci i iniciovat, zastávat tedy funkci prvního posla, ale také dále šířit jako posel třetí (Carafoli, 2002).

K vybraní  $\text{Ca}^{2+}$  jako všudypřítomného buněčného posla přispěla i jeho vazebná chemie, díky které je schopen interagovat s různými biologickými molekulami v jejich reakčních centrech. Díky své molekulární struktuře, valenci a vazebné síle  $\text{Ca}^{2+}$  vykazuje značnou afinitu k oxidu uhličitému, který je přítomen u aminokyselin glutamové a asparagové, které jsou v proteinech významně zastoupeny. K vazebným parametrům dále patří i rychlá vazebná kinetika, se kterou se na protein váže i od něj disociuje (Ochiai, 1991).

#### 3.1 PRINCIPY VÁPŇÍKOVÉ SIGNALIZACE

Jedná se o způsob signalizace, založený na změnách vnitrobuněčné koncentrace iontů  $\text{Ca}^{2+}$ . Pro samotnou signalizaci je důležitý fakt, že buňky si udržují ve svém vnitrobuněčném prostředí nízkou koncentraci volného  $\text{Ca}^{2+}$ , kdy vnitrobuněčná koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$  z angl. Intracellular Calcium Concentration) dosahuje hodnoty okolo 100 nM a vnější koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_e$  z angl. Extracellular Calcium Concentration) je přibližně 1 mM (Ochiai, 1991). Rozdíl koncentrací vytváří silný chemický gradient směřující tok  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky. Vápenaté kationty jsou do buňky taženy také gradientem elektrickým díky svému kladnému náboji a záporně nabitému vnitřku buňky.

Toky  $\text{Ca}^{2+}$  (Obr. 7) probíhají mezi třemi hlavními zdroji – vnějším prostředím a buněčnými organelami, kterými jsou endoplazmatické retikulum (ER) a mitochondrie. Tok  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky se děje prostřednictvím membránových kanálů. Po skončení signalizace se buňka zbavuje přebytečného  $\text{Ca}^{2+}$  pomocí membránových transportérů – pump a výměníků (Berridge *et al.*, 2000).



### 3.1.1 Vstup vápníku do buňky

Mechanismus uvolnění  $\text{Ca}^{2+}$  z vnitřních zdrojů probíhá jako  $\text{Ca}^{2+}$  indukované  $\text{Ca}^{2+}$  uvolnění (CICR z angl. Calcium-induced Calcium Release), jelikož při něm dochází k autokatalytickému procesu, při němž cytoplasmatické  $\text{Ca}^{2+}$  aktivuje uvolnění dalšího  $\text{Ca}^{2+}$  z ER (Berridge *et al.*, 2000).

Zásadním zdrojem  $\text{Ca}^{2+}$  signalizace je ER, které má na své membráně navázané inositol-1,4,5-trifosfátové receptory ( $\text{IP}_3\text{Rs}$  z angl. Inositol-1,4,5-triphosphate Receptors) a ryanodinové receptory ( $\text{RyRs}$  z angl. Ryanodine Receptors).  $\text{IP}_3\text{Rs}$  otevírají kanály v membráně ER po navázání inositol-1,4,5-trifosfátu ( $\text{IP}_3$  z angl. Inositol-1,4,5-triphosphate), který je produkován po aktivaci metabotropních s G-proteiny spřažených receptorů (GPCRs z angl. G protein-coupled receptors) (Berridge, 2009). Na produkci  $\text{IP}_3$  se podílí spolu s GPCR i aktivace tyrosin-kinázového receptoru (RTK z angl. Receptor Tyrosine Kinase) v plazmatické membráně (PM). (Obr. 7B)

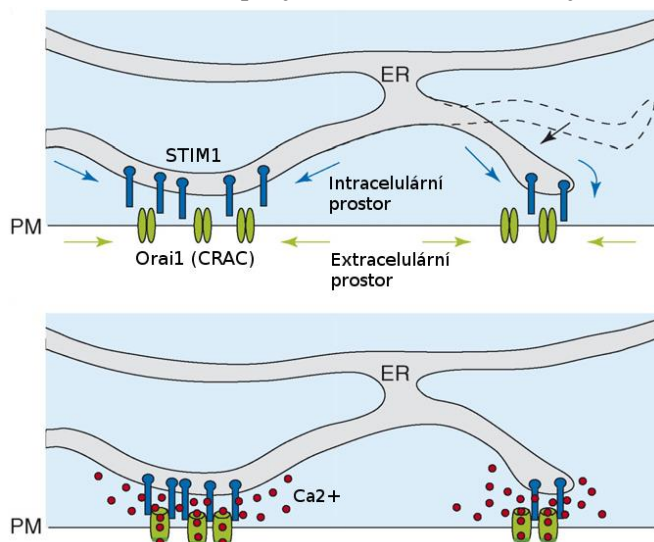
Tok  $\text{Ca}^{2+}$  prostřednictvím  $\text{RyRs}$  nastává přímo po vazbě  $\text{Ca}^{2+}$  a může být podpořen navázáním ATP a dalších adeninových nukleotidů (Meissner, 1984).  $\text{RyRs}$  a tok  $\text{Ca}^{2+}$  může být ovlivněn i přes další regulační molekuly, jakou je například  $\text{Ca}^{2+}$  vazebný protein (CBP z angl. Calcium Binding Protein) kalmodulin (CaM z angl. Calmodulin), který po vazbě s  $\text{Ca}^{2+}$  způsobuje inaktivaci  $\text{Ca}^{2+}$  kanálu navázáním na  $\text{RyRs}$ . Vazba samotného CaM při nízké  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  působí na  $\text{RyRs}$  typu 1 a 3 aktivačně (Yamaguchi *et al.*, 2005).

Z vnějšího prostředí buňky vtékají  $\text{Ca}^{2+}$  skrz ionotropní ligandem či napětím ovládané  $\text{Ca}^{2+}$  kanály (LGCaC z angl. Ligand-gated Calcium Channel a VGCC z angl. Voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$ -selective Channel). V obou případech, ať vazbou ligandu, či změnou napětí, dochází ke změně konformace proteinů tvořících pór či v póru kanálu se nacházejících a k otevření kanálu v membráně. Právě tento primární vtok  $\text{Ca}^{2+}$  z vnějšího prostředí stojí za dalším uvolněním  $\text{Ca}^{2+}$  z vnitřních zdrojů.

TRP iontové kanály (TRP z angl. Transient Receptor Potential) jsou membránové kanály se slabou citlivostí na napětí, poměrně neselektivní, což umožňuje vstup  $\text{Na}^+$  a  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky a její depolarizaci. Na základě sekvenční podobnosti se rozděluje 7 tříd TRP kanálů - TRPA, TRPC, TRPM, TRPML, TRPN, TRPP, a TRPV. Činnost TRP kanálů upravuje aktivace PLC prostřednictvím GPCR a RTK mechanismem, při kterém dochází k štěpení  $\text{PIP}_2$  na  $\text{IP}_3$  a DAG. Další cesta řízení TRP kanálů je skrze podněty jako jsou změna teploty, pH, těkavé chemikálie, rostlinné sloučeniny, purinové nukleotidy a další látky, včetně uměle připravených, které se vážou jako ligand, nebo působí na TRP kanál přímo (Ramsey *et al.*, 2006).

Existuje i mechanismus (SOCE z angl. Store-Operated  $\text{Ca}^{2+}$  Entry) vstupu  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky prostřednictvím iontových kanálů (SOCs z angl. Store-Operated Channels) v PM nezávislý na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , ale aktivovaný při poklesu koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v lumen ER ( $[\text{Ca}^{2+}]_L$  z angl. Lumenal Calcium Concentration). Mechanismus se podařilo rozluštit na základě genetických studií, které identifikovaly geny kódující protein STIM 1 (z angl. Stimal Interaction Molecule), vnímající  $[\text{Ca}^{2+}]_L$  (Liou *et al.*, 2005;

Roos *et al.*, 2005) a podjednotku kanálu, uvolňujícího  $\text{Ca}^{2+}$  po aktivaci vápníkem (CRAC z angl.  $\text{Ca}^{2+}$ -



Release-Activated  $\text{Ca}^{2+}$  Channel), protein Orai1 (lidský homolog *olf186-F*), zvyšující proud v CRAC ( $I_{\text{CRAC}}$ ) (Zhang *et al.*, 2006; Obr. 8)

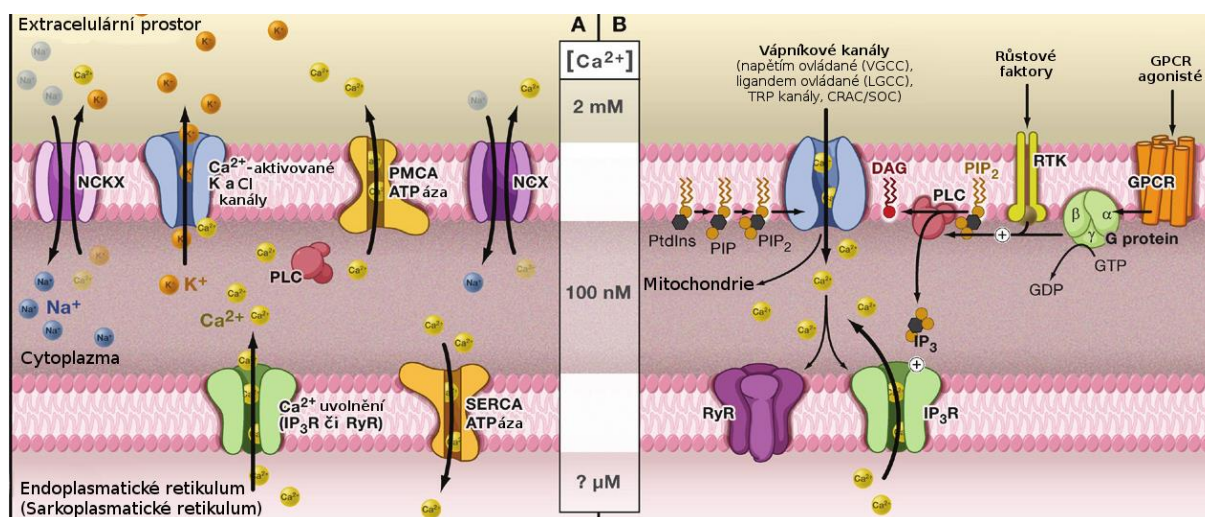
Obr. 8: Model SOCE. Při poklesu  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{L}}$  se STIM 1 shromažďuje v místě, kde je membrána ER v blízkosti PM, kam se přesouvá i Orai1 přímo naproti STIM 1. Komplex STIM1/Orai1 aktivuje CRAC (model kanálu SOC) a  $\text{Ca}^{2+}$  vstupuje do místa zúžení mezi membránou ER a PM. (Upraveno dle Luik & Lewis, 2007)

### 3.1.2 Tok vápníku z buňky

Po skončení  $\text{Ca}^{2+}$  zprostředkované signalizace je nutné obnovení klidové hladiny  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ . Jednou z možností, jak se buňka zbavuje přebytku  $\text{Ca}^{2+}$  je jeho transport přes PM (Obr. 7A) pomocí  $\text{Ca}^{2+}$  pumpy, která využívá energii z ATP (PMCA z angl. Plasma Membrane  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase). Vápník může opustit buňku  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$  výměníkem (NCX) či  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}-\text{K}^{+}$  výměníkem (NCKX). Do ER je  $\text{Ca}^{2+}$  pumpován ATPázovou pumpou (SERCA z angl. Smooth Endoplasmic Reticular  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase). Rozdíl mezi oběma způsoby odčerpávání  $\text{Ca}^{2+}$  z buňky se podílí na pestrosti  $\text{Ca}^{2+}$  signalizace. Zatímco membránové pumpy projevují k  $\text{Ca}^{2+}$  vysokou afinitu na úkor nízké transportní kapacity a jsou schopné udržet dlouhodobě pouze nízkou  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ , výměníky to mají naopak a hrají roli v případech, kdy je nutné na krátkou dobu rychle upravit  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ , například během generování AP u neuronů (Guerini *et al.*, 2005).

Důležitou roli v regulaci  $\text{Ca}^{2+}$  představují mitochondrie. Ty jsou na mnoha místech v kontaktu s ER a jsou vystaveny uvolnění  $\text{Ca}^{2+}$  z  $\text{IP}_3\text{R}$  kanálů (Rizzuto *et al.*, 1998). Mitochondrie vychytávají uvolněný  $\text{Ca}^{2+}$  skrze uniport (Csordás *et al.* 1999). Zpět do cytoplazmy je  $\text{Ca}^{2+}$  přepravován mitochondriálním pórem (MPTP z angl. Mitochondrial Permeability Transition Pore) a NCX,  $\text{Ca}^{2+}$  následně plní ER nebo opouští buňku skrze PM (Bernardi, 1999). MPTP je aktivován zvýšenou hladinou  $\text{Ca}^{2+}$  v matrix mitochondrie, uvolňuje  $\text{Ca}^{2+}$ , generuje  $\text{Ca}^{2+}$  vlny a může přispívat k znásobení  $\text{Ca}^{2+}$  signálu iniciovaného ER (Ichas *et al.*, 1997). Přílišné uvolnění  $\text{Ca}^{2+}$  skrze MPTP vede k selhání membránového potenciálu, následuje uvolnění cytochromu c a iniciace apoptózy (Szalai *et al.*, 1999).

Organizace  $\text{Ca}^{2+}$  signálů je jednak časová, jednak prostorová zajištěná distribucí  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů, výměníků a pump v membráně a CBP v cytoplasmě či uvnitř organel. Role CBP je další důležitá součást tvarování amplitudy a kontroly délky trvání  $\text{Ca}^{2+}$  signálu. Příkladem je již výše popsáný CaM.



Obr. 7: Tok  $Ca^{2+}$  do buňky a z ní. (A) V klidovém stavu je  $[Ca^{2+}]_i$  nízká a nabývá hodnoty okolo 100 nM, což je hodnota  $2 \cdot 10^4$  nižší než  $[Ca^{2+}]_e$ . Aby se  $[Ca^{2+}]_i$  zvýšila a došlo k signalizační akci, musí  $Ca^{2+}$  do buňky vtéci. To se děje prostřednictvím kanálů (kanály ovládané ligandy  $IP_3R$  či  $RyR$  z ER). Po ukončení signalizační akce dochází k obnovení klidové hodnoty  $[Ca^{2+}]_i$  a  $Ca^{2+}$  buňku opouští prostřednictvím membránových pump a výměníků. K odčerpání  $Ca^{2+}$  do ECS slouží PMCA, prostřednictvím SERCA je  $Ca^{2+}$  vracen do ER. Na regulaci  $[Ca^{2+}]_i$  se také podílí (NCX) a  $Na^+/Ca^{2+}$ - $K^+$  výměník (NCKX) využívající na transport  $Ca^{2+}$  spolu s  $K^+$  energii z gradientu sodných iontů ( $Na^+$ ). Zvýšená  $[Ca^{2+}]_i$  má za následek aktivaci  $K^+$  kanálů a u některých buněk i chloridových ( $Cl^-$ ) kanálů, která následně vede k hyperpolarizaci buňky. Snížená aktivita VGCC po hyperpolarizaci je kompenzována jinými  $Ca^{2+}$  kanály. (B) **Samotný průběh signalizace  $Ca^{2+}$ .** V PM jsou aktivovány ionotropní kanály změnou napětí, či navázáním příslušného ligandu na receptor jak extra- tak i intracelulárně. Skrze tyto kanály dochází k toku  $Ca^{2+}$  po koncentračním spádu, čímž se iniciuje další uvolnění  $Ca^{2+}$  z jeho hlavního zdroje – ER (přes  $RyR$ , které jsou přímo citlivé na  $Ca^{2+}$  a  $IP_3R$ ). Metabotropní GPCR a RTK po vazbě příslušných ligandů (hormonů, růstových faktorů, neurotransmiterů atd.) aktivují PLC, která štěpí  $PIP_2$  na  $IP_3$  a diacylglycerol (DAG).  $IP_3$  se váže na  $IP_3R$ , který otevírá příslušný kanál v membráně ER pro uvolnění  $Ca^{2+}$ . (Upraveno dle Clapham, 2007)

### 3.2 VÁPŇÍKOVÁ SIGNALIZACE U ASTROCYTŮ

Signalizace  $Ca^{2+}$  představuje formu vzrušivosti, kterou astrocyty používají k vzájemné komunikaci mezi sebou i s okolními buňkami a k regulaci fyziologických funkcí, které zastávají. Prvotní doklad o tom, že i astrocyty prokazují vzrušivost založenou na změnách  $[Ca^{2+}]_i$ , podává studie Cornell-Bella a spoluautorů (1990). V této studii autoři pozorovali odpověď na podráždění Glu ve formě intracelulárních  $Ca^{2+}$  oscilací a intercelulárních  $Ca^{2+}$  vln (dvou hlavních forem šíření  $Ca^{2+}$  signálu) u astrocytů v kultuře z hipokampu zobrazenou po použití  $Ca^{2+}$  indikátoru fluo-3. Později bylo objeveno, že komunikace mezi neurony a astrocyty není pouze jednosměrná a astrocyty ovlivňují i aktivitu neuronů a modulují synaptický přenos (Nedergaard, 1994; Pasti *et al.*, 1997).

K aktivaci  $Ca^{2+}$  signálu u astrocytů a k následnému uvolnění Glu a aspartátu dochází po vazbě neurotransmiteru ATP na metabotropní purinoreceptory  $P_2$  ( $P_2Y$ ), což aktivuje kaskádu reakcí, stojící za produkcí  $IP_3$  a uvolněním  $Ca^{2+}$  z vnitřních zdrojů prostřednictvím  $IP_3R$  (Jeremic *et al.*, 2001). ATP či Glu aktivuje i ionotropní purinoreceptory ( $P_2X$ ) astrocytů (Illes *et al.*, 2011).

Po uvolnění gliotransmiteru Glu astrocyty dochází k aktivaci receptorů kyseliny N-methyl-D-asparagové (NMDAR z angl. N-methyl-D-aspartate Receptor) a zvýšení  $[Ca^{2+}]_i$  v neuronech, což vede ke stimulaci synaptického přenosu (Parpura *et al.*, 1994) a k zvýšení aktivity sousedních neuronů (Fellin *et al.*, 2004).

Vnitrobuněčné zdroje  $Ca^{2+}$  u astrocytů převládají v iniciaci mechanicky vyvolaného uvolnění Glu, které je podpořeno i vtokem  $Ca^{2+}$  z mimobuněčného prostředí (Hua *et al.*, 2004). Hlavním intracelulárním zdrojem  $Ca^{2+}$  je ER.

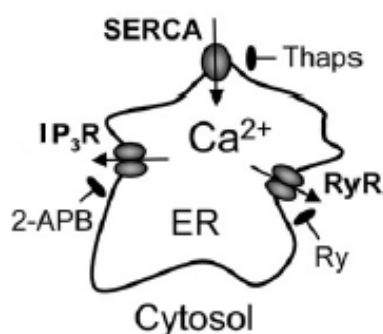
### 3.2.1 Úloha ER ve vápníkové signalizaci u astrocytů

ER uvolňuje  $Ca^{2+}$  dvěma mechanismy – prostřednictvím  $IP_3$ Rs a RyRs, kdy první je ovládaný  $IP_3$  a druhý kafeinem/ryanodinem (Ry) (Golovina & Blaustein, 1997). Hua a spoluautoři (2004) ve studii na kultuře jednotlivých na sobě nezávislých astrocytů potvrdili roli těchto dvou mechanismů v uvolnění  $Ca^{2+}$  z ER mající za následek uvolnění Glu z astrocytů. S použitím značených protilátek proti  $IP_3$ R typu 2 dokázali přítomnost tohoto receptoru u astrocytů a v přítomnosti  $IP_3$  a indikátoru  $Ca^{2+}$  fluo-3 vystavili astrocyty světelnému UV pulsu o délce 3 ns, což způsobilo zvýšení  $[Ca^{2+}]_i$ . K důkazu přítomnosti druhého mechanismu inkubovali astrocyty s fluorescenčně značeným Ry (Obr. 9) a pro prokázání funkce tohoto mechanismu v uvolnění  $Ca^{2+}$  z ER a v následném zvýšení  $[Ca^{2+}]_i$  inkubovali astrocyty s kafeinem. Inkubace prokázaly přítomnost mechanismu i jeho roli ve zvýšení  $[Ca^{2+}]_i$ . Snížení nárůstu  $[Ca^{2+}]_i$ , který byl vyvolán mechanicky a následný pokles v množství uvolněného Glu autoři zaznameli u astrocytů v roztoku 2-aminoethylesteru kyseliny difenylborité (2APB z angl. 2-aminoethoxydiphenyl borate; Obr. 9). 2APB funguje jako antagonist k  $IP_3$ , váže se místo něj na  $IP_3$ R v ER membráně, ale neváže se na receptory v PM a nebrání tak toku  $Ca^{2+}$  z ECS (Maruyama *et al.*, 1997). Méně Glu se uvolnilo při předchozím nižším hromadění  $[Ca^{2+}]_i$  v případě inkubace astrocytů s Ry, který může zamezit uvolnění  $Ca^{2+}$  z ER a při trvalé inkubaci s kafeinem, která sice umožňuje průchod  $Ca^{2+}$  přes trvale otevřené RyR, ale zároveň blokuje  $IP_3$ R (Ehrlich *et al.*, 1994).

Role RyRs u astrocytů je spekulativní kvůli jejich nejednotné přítomnosti u těchto glií v různých oblastech mozku. Parri & Crunelli (2003) pozorovali přítomnost RyRs po aplikaci kafeinu u astrocytů v krysím *thalamu*. Na druhou stranu aplikace kafeinu u astrocytů v krysích a myších hipokampálních řezech nevyvolala téměř žádné zvýšení  $[Ca^{2+}]_i$  (Beck *et al.*, 2004).

Výskyt pouze  $IP_3$ R typu 2 v ER membráně u astrocytů v krysím mozku byl prokázán za použití dvou protilátek, které se vázaly na různé oblasti N-konce peptidové sekvence  $IP_3$ R typu 2 a jedné protilátky vázající se na peptidovou sekvenci C-konce  $IP_3$ R typu 3 (Holtzclaw *et al.*, 2002). S použitím  $IP_3$ R2-negativních myší byla prokázána primární úloha těchto receptorů na zvýšení  $Ca^{2+}$  především u astrocytů (Petravicz *et al.*, 2008). Nejčastěji se  $IP_3$ R2 vyskytují v distálních výběžcích astrocytů, které jsou v kontaktu se synapsemi (Holtzclaw *et al.*, 2002).

Předchozí mechanismy  $Ca^{2+}$  z ER odčerpávaly. SERCA (Obr. 9) znovu plní ER, což je nezbytné pro možnost zvýšení  $[Ca^{2+}]_i$  po mechanické stimulaci a tedy i pro uvolňování Glu z astrocytů, jak



potvrdily experimenty, při nichž byla SERCA inhibována tapsigarginem (Hua *et al.*, 2004; Innocenti *et al.*, 2000).

Obr. 9: Lokalizace působení inhibitorů transportu  $\text{Ca}^{2+}$  v ER. V kultuře kortikálních astrocytů byl tok  $\text{Ca}^{2+}$  skrze SERCA inhibován tapsigarginem, k blokaci RyR a  $\text{IP}_3\text{R}$  byl použit ryanodin a 2-APB. (Upraveno dle Parpura *et al.*, 2011)

Vnitrobuněčné  $\text{Ca}^{2+}$  oscilace mají svůj počátek v uvolnění  $\text{IP}_3$  molekuly po stimulaci mechanické (Hua *et al.*, 2004), elektrické (Nedergaard, 1994) či neurotransmiterem (Cornell-Bell *et al.*, 1990; Jeremic *et al.*, 2001). Malé lokální uvolnění  $\text{Ca}^{2+}$  vyvolané vazbou  $\text{IP}_3$  na příslušný receptor aktivuje sousední kanály, které kromě zesílení  $\text{Ca}^{2+}$  signálu o další uvolněné  $\text{Ca}^{2+}$  dále pomáhají šířit vlnu  $\text{Ca}^{2+}$  aktivací dalších kanálů podél membrány ER. K  $\text{Ca}^{2+}$  oscilacím přispívají následně i kanály v PM (Obr. 10).  $\text{Ca}^{2+}$  oscilace mohou přecházet i za hranici PM a ovlivňovat  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  u dalších buněk ve formě intercelulárních  $\text{Ca}^{2+}$  vln. Tento jednoduchý mechanismus akce-reakce je základem šíření  $\text{Ca}^{2+}$  signálů ve všech typech nevzrušivých buněk. Vápníkovými vlnami se nešíří vždy ionty  $\text{Ca}^{2+}$  jako takové. Jedná se přesněji o vlnu aktivace otevírání kanálů v membráně ER a následně i v PM, která může přerůst za hranici buňky a ovlivnit až stovky buněk (Kuga *et al.*, 2011). Vápníkové vlny se mohou šířit přes mezerové spoje spojující PM dvou sousedních buněk, prostřednictvím difuze  $\text{IP}_3$  či  $\text{Ca}^{2+}$  či pomocí gliotransmiteru ATP, který vyloučí jedna buňka a aktivuje jím buňku druhou (Anderson *et al.*, 2004).

### 3.2.2 Úloha extracelulárního vápníku v signalizaci u astrocytů

*Mechanismus SOCE* přes SOC kanály v PM po vyprázdnění ER u astrocytů se děje v místech přiblížení membrány ER a PM, to potvrzuje studie Goloviny (2005). TRPC v PM u astrocytů zprostředkovávají SOCE do značné míry. Po inkubaci s protilátkou proti TRPC1 k SOCE téměř nedochází a současně je sníženo množství uvolněného Glu. Astrocyty *in vitro* a izolované ze zrkové kůry exprimují TRPC1, TRPC4 a TRPC5 proteinové komponenty kanálu SOC (Malarkey *et al.*, 2008).  $I_{\text{CRAC}}$  v mechanismu SOCE u astrocytů nebyl přímým měřením zaznamenán, ale kapacitní  $\text{Ca}^{2+}$  vstup (CCE z angl. Capacitative Calcium Entry) aktivovaný poté, co došlo k vyprázdnění vnitřních zdrojů po Glu indukovaném vtoku  $\text{Ca}^{2+}$ , byl popsán u krysích kortikálních astrocytů typu I (Pizzo *et al.*, 2001). Role CCE v aktivaci TRPC se neprokázala (Grimaldi *et al.*, 2003).

*Ligandem ovládané ionotropní receptory* jsou další možností vstupu  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky. K hlavním LGCaC u astrocytů patří Glu ovládané receptory kyselin  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionové (AMPA z angl.  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) a NMDA a purinoreceptory  $\text{P}_2\text{X}$  (Lalo *et al.*, 2011).

Bergmannovy glie v krysím mozečku neexprimují geny pro GluR-B (GluR2) podjednotku AMPA receptorů, což způsobuje propustnost těchto receptorů pro  $\text{Ca}^{2+}$  (Burnashev *et al.*, 1992). Rychlá ztráta citlivosti AMPAR na Glu limituje vstup  $\text{Ca}^{2+}$  a AMPAR nemají na  $\text{Ca}^{2+}$  signalizaci zásadní podíl.

NMDAR astrocytů disponují větší propustností a přibližně dvacetkrát vyšší citlivostí na Glu než AMPAR, čímž zajišťují transport  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky. Měření na stejné buňce myšího kortikálního astrocytu navíc prokázalo odlišnou aktivaci obou receptorů v závislosti na hladině Glu a tedy možnou schopnost astrocytu detekovat jeho množství (Lalo *et al.*, 2006).

Po uvolnění neurotransmiteru synapsí je podíl na  $\text{Ca}^{2+}$  signalizaci astrocytů zajištěn NMDAR a  $\text{P}_2\text{X}_{1/5}$ , což potvrdila měření propustnosti těchto receptorů pro  $\text{Ca}^{2+}$  *in situ*. Propustnosti NMDAR a  $\text{P}_2\text{X}_{1/5}$  pro  $\text{Ca}^{2+}$  jsou ve srovnání s neurony nižší, ale pro zvýšení  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  v astrocytech dostačující. Amplitudy toku  $\text{Ca}^{2+}$  ionotropními receptory jsou srovnatelné s amplitudami vyvolanými metabotropními receptory (Palygin *et al.*, 2010). Farmakologická studie NMDAR u myších kortikálních astrocytů testovala účinek memantinu a UBP141. Memantin prokazuje různou afinitu k N2A/B a N2C/D podjednotkám, UBP141 se selektivně váže na N2C/D podjednotku. Obě farmaka se váží k NMDAR astrocytů s vysokou afinitou, což značí přítomnost právě NC2/D podjednotky u astrocytů. Studie na základě biofyzikálních a farmakologických výsledků identifikovala NMDAR jako tri-heteromer složený z podjednotek N1, N2C/D a N3 (Palygin *et al.*, 2011). Mimořádná citlivost k ATP byla prokázána u purinoreceptorů  $\text{P}_2\text{X}_{1/5}$ , které po stimulaci způsobily nárůst  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Lalo *et al.*, 2008).

Vstup  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky po aktivaci acetylcholinových receptorů nikotinem (nAChRs z angl. Nicotinic Acetylcholine Receptors) byl prokázán u kortikálních myších astrocytů *in vitro* prostřednictvím CICR skrze VGCC spíše než z ER (Oikawa *et al.*, 2005).

*Napěťově ovládané vápníkové kanály* se účastní uvolnění Glu z astrocytů. Ke snížení mechanicky vyvolaného uvolnění Glu *in vitro* dochází v přítomnosti kademnatých iontů ( $\text{Cd}^{2+}$ ), které blokují  $\text{Ca}^{2+}$  kanály, což potvrzuje spoluúčast vtoku extracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  na uvolnění Glu (Hua *et al.*, 2004).

U astrocytů v kultuře byla RT-PCR a Western blot analýzami i imunohistochemicky zjištěna přítomnost třech typů VGCCs - proteinů  $\alpha 1\text{B}$  (N-typ),  $\alpha 1\text{C}$  (L-typ), and  $\alpha 1\text{E}$  (R-typ), ale ne proteinu  $\alpha 1\text{A}$  (P/Q typ) (Latour *et al.*, 2003). Stejně výsledky poskytlo i elektrofyziologické měření jak na celých buňkách, tak samotných kanálech, které zaznamenalo různou míru aktivity pouze u L-(Cav1.2), N- (Cav2.2), a R- (Cav2.3) typu VGCCs. Imunohistochemická blokace P/Q kanálu neměla téměř žádný vliv na hodnotu měřeného proudu barnatých iontů ( $\text{Ba}^{2+}$ ) a tedy na potenciální vtok  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky (D'Ascenzo *et al.*, 2004). T- a L-typ VGCCs u astrocytů subventrikulární zóny a L-typ u krysích astrocytů ventrobazálního thalamu se podílí na vtoku  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky a tvorbě  $\text{Ca}^{2+}$  oscilací (Young *et al.*, 2010; Parri & Crunelli, 2003).

V patologických podmínkách nastávajících při a po *status epilepticus* vyvolaných aplikací pilokarpinu byla nejdříve po jednom týdnu a nejdéle do dvou měsíců indukována exprese Cav1.3 a Cav2.1 u reaktivních astrocytů v myším hipokampu. To naznačuje podíl  $\text{Ca}^{2+}$  signalizace reaktivních astrocytů na průběhu záchvatu (Xu *et al.*, 2007).

Depolarizace astrocytů vysokou mimobuněčnou koncentrací  $\text{K}^+$ , která je charakteristická např. pro ischemická poškození CNS, vede k aktivaci VGCC, zvýšení  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  a následnému uvolnění Glu.

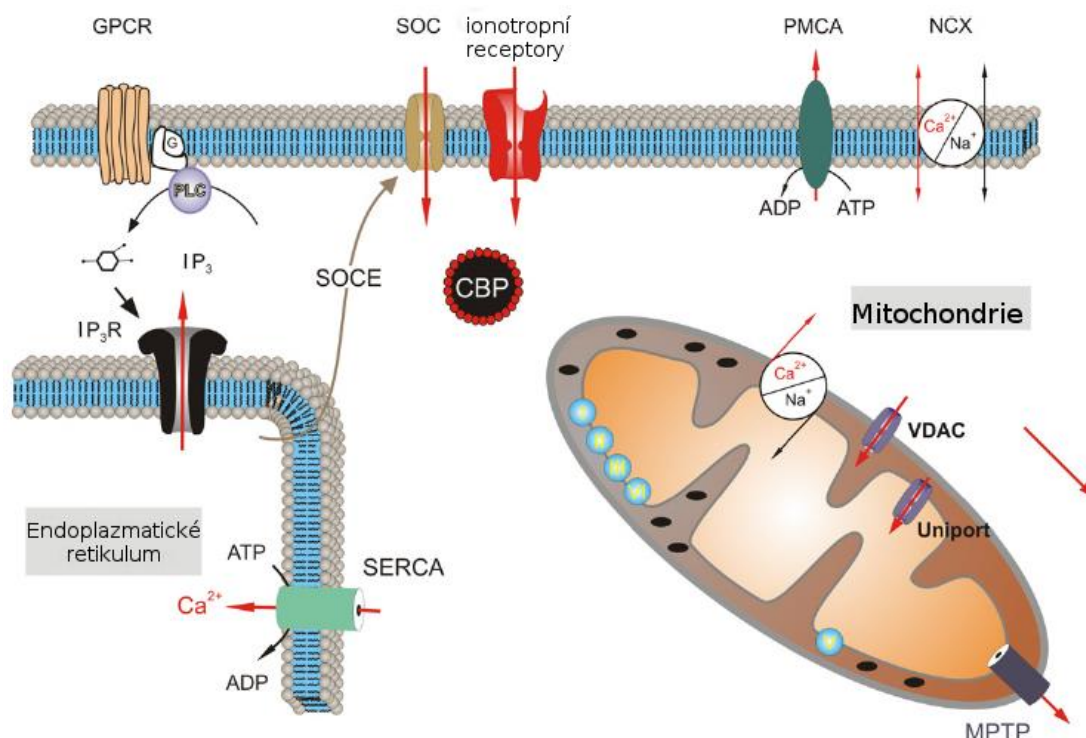


Inhibice VGCC pomocí  $\text{Cd}^{2+}$  či snížením množství  $\text{Ca}^{2+}$  extracelulárně nárůstu  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  a uvolnění Glu zabráni. (Yaguchi & Nishizaki, 2010).

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  výměník se u astrocytů vyskytuje ve všech třech typech – NCX1, NCX2 a NCX3, které jsou lokalizovány v perisynaptických výběžcích neokortikálních a hipokampálních astrocytů, hlavně v těch, které obklopují synapse (Minelli et al., 2007). Toky  $\text{Ca}^{2+}$  zprostředkované NCX byly pozorovány v kulturách krysích astrocytů mozkové kůry (Goldman et al., 1994) a astroglálních buňkách *in situ* (Kirischuk et al., 1997).

NCX ovlivňuje  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oběma směry – hrají roli jak ve vstupu  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky, tak v jeho vyloučení z vnitrobuněčného prostředí. To, jakým směrem  $\text{Ca}^{2+}$  poteče a jak jej tedy NCX bude přepravovat, závisí na transmembránovém gradientu  $\text{Na}^+$  a membránovém potenciálu (pokud je úroveň intracelulárního  $\text{Na}^+$  vysoká a při depolarizaci, NCX transportuje  $\text{Ca}^{2+}$  z buňky a naopak při snížení hladiny extracelulárního  $\text{Na}^+$ , NCX transportuje  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky) (Goldman et al., 1994). Reverzní fungování NCX je zesíleno v hypotonickém roztoku a naopak zeslabeno v roztoku hypertonickém (Rojas et al., 2008). Slabá depolarizace astrocytů *in vitro*, kterou doprovází zvýšení extracelulárního  $\text{K}^+$ , také vede k reverznímu fungování NCX (Paluzzi et al., 2007).

Pro uvolnění Glu prostřednictvím CICR mechanismu z astrocytů je klíčová lokalizace NCX v blízkosti RyRs (Rojas et al., 2007). Pokud je NCX blokován inhibitory KB-R7943 a SEA0400, L-Glu či L-aspartát přestává mít na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  vliv. L-Glu navíc aktivuje reverzní fungování NCX, které způsobuje vstup  $\text{Na}^+$  pomocí elektrogenních Glu transporterů namísto ionotropních L-Glu receptorů, což prokázala inhibice těchto  $\text{Na}^+$  vstupů (Rojas et al., 2007).



Obr. 10: Principy  $\text{Ca}^{2+}$  signalizace u astrocytů. Zvýšení  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  způsobené vstupem  $\text{Ca}^{2+}$  z mimobuněčného prostoru zajišťují kanály v PM (SOC, ionotropní receptory). Pumpy (PMCA) a výměníky (NCX) vylučují  $\text{Ca}^{2+}$  do ECS. NCX může pracovat oběma směry v závislosti na intracelulární koncentraci  $\text{Na}^+$ . Vyloučení

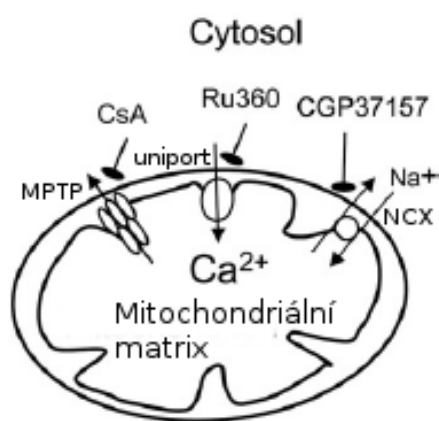
$\text{Ca}^{2+}$  z ER je závislé na stimulaci  $\text{IP}_3\text{R}$  po aktivaci GPCRs a PLC. SERCA  $\text{Ca}^{2+}$  do ER vrací. Na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mají také vliv CBPs a mitochondrie, do které  $\text{Ca}^{2+}$  vstupuje napěťově závislými aniontovými kanály (VDAC z angl. Voltage-dependent anion channels) a uniportem díky elektrochemickému gradientu směřujícímu  $\text{Ca}^{2+}$  do matrix. Na uvolnění  $\text{Ca}^{2+}$  se podílí NCX a MPTP. (Upraveno dle Verkhratsky et al., 2012)

### 3.2.3 Úloha mitochondrií ve vápníkové signalizaci u astrocytů

Mitochondrie hrají roli v  $\text{Ca}^{2+}$  signalizaci astrocytů v případě, kdy buňka potřebuje hladinu  $\text{Ca}^{2+}$  snížit, ale zároveň jsou i zdrojem  $\text{Ca}^{2+}$ . Dle Reyes & Parpury (2008) mitochondrie v astrocytech mění  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  a tím pomáhají koordinovat uvolnění Glu z buňky.

Uvolnění  $\text{Ca}^{2+}$  z mitochondrií probíhá prostřednictvím  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  výměníku, jehož inhibice pomocí 7-chloro-5-(2-chlorofenyl)-1,5-dihydro-4,1-benzothiazepin-2(3H)-onu (CGP37157; Obr. 11) snižuje vzestup  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Stejný efekt má i inhibice MPTP cyklosporinem A (CsA z angl. Cyclosporin A; Obr 11), která také vede k hromadění  $\text{Ca}^{2+}$  v mitochondriích a tedy menšímu vzestupu  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Reyes & Parpura, 2008).

Vstup  $\text{Ca}^{2+}$  do mitochondrie je zprostředkován uniportem, což dokazují Reyes & Parpura (2008) pokusem, při kterém inhibují mitochondriální  $\text{Ca}^{2+}$  uniport Ruthenium 360 (Ru360; Obr. 11). Vychytávání  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondriemi je zastaveno, což se projeví ve zvýšení  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  u astrocytů *in vitro*. Změny  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  vyvolané danými farmaky aplikovanými na mitochondrie mají v konečném důsledku dopad na hladinu uvolněného Glu astrocyty. Pokud bylo uvolnění  $\text{Ca}^{2+}$  z mitochondrie blokováno



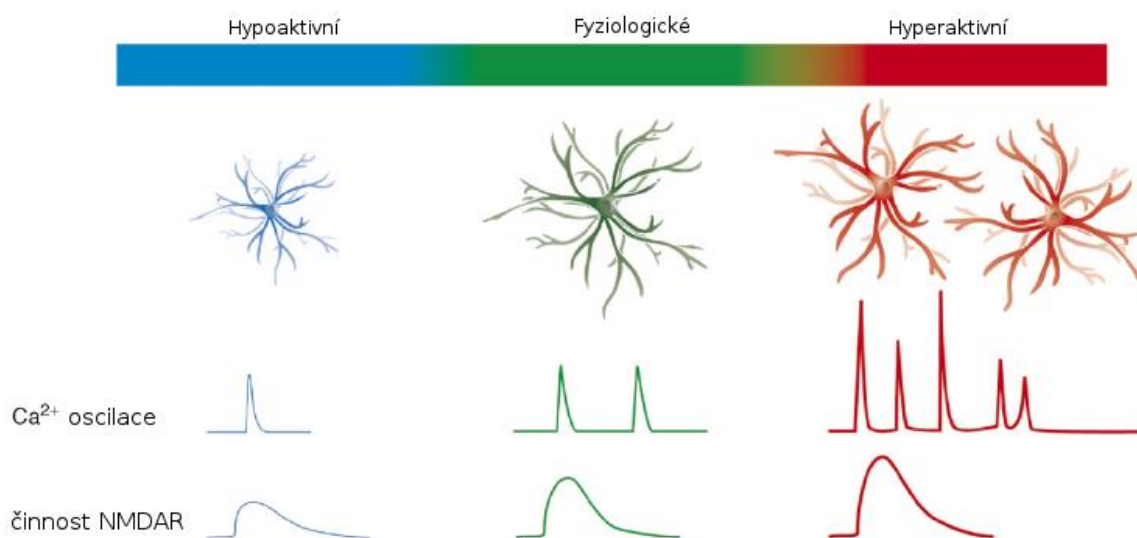
CGP37157 či CsA, došlo k redukci množství uvolněného Glu, opačný efekt (tj. nárůst Glu) měla inhibice mitochondriálního uniportu pomocí Ru360. (Reyes & Parpura, 2008)

Obr. 11: Lokalizace působení inhibitorů transportu  $\text{Ca}^{2+}$  u mitochondrie. V kultuře kortikálních astrocytů byla role mitochondrií ve vyrovnávání  $\text{Ca}^{2+}$  farmakologicky měřena a vyhodnocena. Využity byly inhibitory ruthenium 360, bránící toku  $\text{Ca}^{2+}$  uniportem, cyklosporin A, blokující MPTP a CGP37157, inhibující NCX. (Upraveno dle Parpura et al., 2011)



## 4 VÁPŇÍKOVÁ SIGNALIZACE U ASTROCYTŮ V PATOLOGICKÝCH STAVECH

Vápník u astocytů zastává dvě hlavní úlohy – signalizační a v udržení homeostázy iontů a neurotransmiterů. Nedostatečná či nadměrná činnost vlivem přirozeného stárnutí (Mathiesen *et al.*, 2013), změn v genové expresi či poškozením mozkové tkáně po zranění vede k patologickým stavům, které se v konečném důsledku projeví jako různá neurodegenerativní onemocnění, epilepsie, ischemie, neurologické a psychiatrické poruchy.



Obr. 12: Vliv nedostatečné, fyziologické a nadměrné  $\text{Ca}^{2+}$  aktivity na aktivitu NMDAR. Závislost aktivity NMDAR na  $\text{Ca}^{2+}$  oscilacích u astrocytů. Barevně je znázorněna (od modré přes zelenou až po červenou) rostoucí aktivita astrocytů. Modrá a červená reprezentují patologické stavy hypo a hyperaktivity astrocytů, kdy frekvence  $\text{Ca}^{2+}$  oscilací je příliš nízká či vysoká, což se adekvátně promítá i do aktivity NMDAR. Nadměrná aktivita astrocytů přispívá k epileptickým stavům, zatímco nedostatečná aktivita k schizofrenii. (Upraveno dle Halassa *et al.*, 2007b)

Dysregulace  $\text{Ca}^{2+}$  signalizace při patologických stavech vede k nadměrné vzrušivosti neuronů, která je pro ně toxická. V narušení  $\text{Ca}^{2+}$  homeostázy hraje roli patologická aktivace gliových buněk, astrocyty nevyjímaje. Typickým projevem je i zánětlivá odpověď a produkce kyslíkových radikálů mitochondriemi astrocytů, které také následně ovlivňují  $\text{Ca}^{2+}$  signalizaci a homeostázu. Pro reaktivní astrogliózu je charakteristické zvětšení buněčného objemu, narušení  $\text{Ca}^{2+}$  homeostázy a signalizace, produkce zánětlivých faktorů (interleukinu  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) či faktoru nádorové nekrózy  $\alpha$  (TNF- $\alpha$  z angl. Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ )), změny v genové expresi a ve funkcích, které astrocyty zastávají (Jou, 2008; Yu *et al.*, 2014)

### 4.1.1 Nadměrná vzrušivost neuronů

Toxická vzrušivost vedoucí ke smrti motorických neuronů je charakteristickým rysem ALS. Na SOD1 (superoxid dismutáza) mutantním myším modelu ALS byly zkoumány změny v homeostáze  $\text{Ca}^{2+}$  a exocytózy u SOD1G93A astrocytů, způsobené nadměrným vyloučením  $\text{Ca}^{2+}$  z ER po aktivaci purinergních receptorů. K narušení  $\text{Ca}^{2+}$  homeostázy zvýšením  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  přispěl i SOCE indukovaný změnami proteinu STIM1. Zvýšení  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  způsobilo uvolnění gliotransmiteru ATP z astrocytů, které

bylo zastaveno inhibicí exocytózy expresí dominantně negativního SNARE, což v konečném důsledku zabránilo toxickému působení astrocytů na neurony. (Kawamata *et al.*, 2014)

Neurotoxická A $\beta$  ( $\beta$ -amyloidu), jehož akumulace je typickým rysem AD, negativně působí na Ca<sup>2+</sup> signalizaci. Nejen, že Ca<sup>2+</sup> signály u astrocytů evokuje (Abramov *et al.*, 2003), také ovlivňuje jejich šíření zesílením propagace Ca<sup>2+</sup> vln zprostředkované ATP či mezerovými spoji (Haughey & Mattson, 2003), působením na VGCC L-typu (Rovira *et al.*, 2002) a sám je schopen aktivně se podílet na jejich šíření tvorbou kanálů v PM (Lin *et al.*, 2001).

Působením A $\beta$  peptidu (1-42) i jeho fragmentu (25-35) dochází k zvýšení [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> a ke tvorbě intracelulárních Ca<sup>2+</sup> oscilací trvajících hodiny u astrocytů, ale ne u neuronů ve společné kultuře. K smrti neuronů přesto dochází díky vyprázdnění astrocytárních a následně i neuronálních Ca<sup>2+</sup> závislých zdrojů glutathionu (GSH). To naznačuje primární cílení A $\beta$  v neuronální toxicitě právě na astrocyty. Nárůst [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> je způsoben tokem Ca<sup>2+</sup> přes PM (Abramov *et al.*, 2003). Nižší A $\beta$  indukovaný růst [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> u astrocytů *in vitro* nastává po přidání inhibitorů PLC bránícím uvolnění Ca<sup>2+</sup> z ER (Alberdi *et al.*, 2013). Při použití inhibitorů Ry a 2APB, inhibujících RyR a IP<sub>3</sub>R v membráně ER, dochází ke snížení patologického efektu A $\beta$  na zvýšenou expresi GFAP a oxidativní a ER stres, což dokazuje negativní vliv A $\beta$  na Ca<sup>2+</sup> homeostázu v ER. A $\beta$  indukují apoptózu mobilizací zdrojů Ca<sup>2+</sup>, hlavně pak ER po aktivaci IP<sub>3</sub>R (Oseki *et al.*, 2014). A $\beta$  narušuje Ca<sup>2+</sup> signalizaci a regulaci Ca<sup>2+</sup> u astrocytů patologickým působením na IP<sub>3</sub>R1 a mGluR5, kdy dochází k jejich navýšení vlivem nadměrné exprese (Grolla *et al.*, 2013; Lim *et al.*, 2013). Tento metabotropní GluR spolu s ionotropními LGCaC stojí za Ca<sup>2+</sup> uvolněním z ER a následně indukovanou gliotransmisí. Nadměrná gliotransmise může ještě více aktivovat samotné astrocyty pozitivní zpětnou vazbou, kdy ATP se váže na P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub>Rs a uvolňuje Glu z astrocytů (Pascual *et al.*, 2012).

Samotná [Ca<sup>2+</sup>]<sub>e</sub> může být prostředníkem neuron-astrocytární komunikace. Lokální snížení [Ca<sup>2+</sup>]<sub>e</sub> evokuje uvolnění ATP astrocyty (Torres *et al.*, 2012) a tak přispívá k jejich hyperaktivitě, která je nezávislá na blízkosti plaků a Ca<sup>2+</sup> vlny se aktivují na dlouhé vzdálenosti (Kuchibhotla *et al.*, 2009).

Trochu jiný pohled na A $\beta$  přinesla studie Lee a spoluautorů (2014), která zkoumá nejen patologické, ale i fyziologické působení těchto proteinů v regulaci signalizace mezi neurony a astrocyty. Přirozeně A $\beta$  působí, pokud je jeho koncentrace nízká v řádech pM a má význam v zesílení synaptické plasticity a poznávacích schopností a vnímání u myši díky zvýšení frekvence i amplitudy cytosolických vápníkových oscilací, které je závislé na  $\alpha$ 7-nAChRs.

Nadměrnou vzrušivostí neuronů jsou postiženi i pacienti trpící různými epileptickými stavy. Prvotní zaměření výzkumu epilepsie se přesunulo z K<sup>+</sup> na Ca<sup>2+</sup> homeostázu, která se ukazuje být zahrnuta v generování záchvatu i v jeho průběhu (Carmignoto & Haydon, 2012). Pokud Ca<sup>2+</sup> indukované uvolnění Glu z astrocytů nad míru aktivuje NMDAR neuronů a způsobí přílišný vtok Ca<sup>2+</sup> do neuronů, dochází tak k nadměrné aktivaci neuronů, která vede k záchvatu (Tian *et al.*, 2005; Obr. 12).

Role astrocytárního Glu a aktivace NMDAR v generování záchvatu se ukázala v některých výzkumech spekulativní (Fellin *et al.*, 2006).

Vápníková signalizace u astrocytů může iniciovat i inhibiční signál. Lokální snížení  $[Ca^{2+}]_e$  způsobí  $Ca^{2+}$  závislé uvolnění ATP z astrocytů, které aktivuje neuronální  $P_2Y_1$  receptory a ty spustí signál bránící šíření záchvatu (Torres *et al.*, 2012).

Neuronální poškození vlivem uvolnění excitačních aminokyselin astrocyty a zvýšení  $[Ca^{2+}]_i$  neuronů je přítomno i v ischemii. Kromě nadměrného uvolnění ATP nemusí astrocyty dostatečně vychytávat Glu ze synaptické štěrby, což nastává při inhibici protein kinázy CaMKII (z angl. Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II) po ischemickém zranění. Tato dysregulace homeostázy  $Ca^{2+}$  může zvyšovat úmrť neuronů po ischemii (Ashpole *et al.*, 2013).

Změny v gliotransmisi přispívají také k schizofrenii. V rozvoji této psychiatrické choroby hraje důležitou roli hladina dopaminu, který indukuje  $Ca^{2+}$  signály u astrocytů ve středním mozku, v kůře i v hipokampu (Vaarmann *et al.*, 2010; Obr. 12). Snížené množství dopaminu je charakteristické u Parkinsonovy choroby, kdy dochází ke ztrátě dopaminových transportérů neuronů a samotných neuronů v *substantia nigra*, což v konečném důsledku vede k poškození kontroly pohybu. Jednou z příčin dopaminové ztráty je zánětlivá reakce gliových buněk a cílení na signalizační kaskádu, která ji spouští by mohlo být jedním z možných terapeutických přístupů (Esposito *et al.*, 2012).

#### 4.1.2 Zánětlivá odpověď

Zánětlivá odpověď je spolu s nadměrnou vzrušivostí klíčová v neurodegenerativních procesech. Aktivace mikroglií a astrocytů vede k  $Ca^{2+}$  závislému uvolnění řady zánětlivých faktorů. Uvolnění  $TNF-\alpha$  a jeho negativní vliv byl popsáno u neurodegenerativních chorob ALS (Poloni *et al.*, 2000), AD (Alvarez *et al.*, 2007) i v ischemii (Liu *et al.*, 1994). Aktivace zánětlivé odpovědi je v AD způsobena peptidy A $\beta$  (Berridge, 2014). Zánětlivé cytokiny mají následně vliv na  $Ca^{2+}$  signalizaci modulací aktivity řady kanálů a receptorů (Sama & Norris, 2013). Příkladem patologického vlivu  $TNF-\alpha$  na regulaci  $Ca^{2+}$  u ALS je inhibice transportu Glu u astrocytů, která zvyšuje lokalizaci ionotropních GluR na synapsích (Santello *et al.*, 2011).

#### 4.1.3 Produkce kyslíkových radikálů

Zvýšená produkce ROS je jedním z projevů patologických podmínek a je  $Ca^{2+}$  závislá. Zvýšené generování ROS u astrocytů, ale ne u neuronů je vyvoláno působením A $\beta$  v AD (Abramov *et al.*, 2004). Do poškození buněk oxidativním stresem jsou zapojeny i TRPV4 kanály vysoce exprimované u krysích hipokampálních astrocytů (Bai & Lipski, 2014). ROS snižují hladinu antioxidantu GSH, který astrocyty dodávají neuronům, díky čemuž mají ROS větší negativní dopad na  $Ca^{2+}$  homeostázu (Abramov *et al.*, 2004).

## 5 ZÁVĚR

---

Vápníková signalizace u astrocytů je důležitým mechanismem pro zajištění funkcí jako regulace synaptického přenosu gliotransmisí, podpora a synchronizace neuronů, zajištění homeostázy, genová exprese a v uvolnění zánětlivých faktorů. Narušení homeostázy  $\text{Ca}^{2+}$  a nesprávné fungování  $\text{Ca}^{2+}$  signalizace u astrocytů vede k selhání v jeho kontrole a patologickému fungování jak samotných astrocytů, tak i neuronů. Tyto dysfunkce se promítají do řady patologických stavů (neurodegenerativní onemocnění, ischemie, epilepsie a psychiatrické choroby). Pochopení mechanismů fyziologického fungování může pomoci odhalit patologické dysfunkce a výzkum v této oblasti by tak mohl přinést nové přístupy a možnosti terapie.

Současné terapeutické přístupy cílí na modulátory  $\text{Ca}^{2+}$  signalizace. Jednou z cest je blokáce receptorů, protože právě jejich přílišná aktivita vede k nadměrné  $\text{Ca}^{2+}$  signalizaci u astrocytů vyvolávající nadměrnou vzrušivost neuronů a jejich toxicitu. Nicméně, zásadním problémem ovlivňování vápníkové signalizace je nedostatečná specifita inhibitorů.

## 6 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- Abramov, A. Y., Canevari, L. & Duchen, M. R. (2003). Changes in intracellular calcium and glutathione in astrocytes as the primary mechanism of amyloid neurotoxicity. *The Journal of Neuroscience*, 23(12), 5088–5095.
- Abramov, A. Y., Canevari, L. & Duchen, M. R. (2004). Calcium signals induced by amyloid Beta peptide and their consequences in neurons and astrocytes in culture. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1742, 81–87.
- Alberdi, E., Wyssenbach, A., Alberdi, M., Sánchez-Gómez, M. V., Cavaliere, F., Rodríguez, J. J., Verkhatsky, A. & Matute, C. (2013). Ca(2+)-dependent endoplasmic reticulum stress correlates with astrogliosis in oligomeric amyloid  $\beta$ -treated astrocytes and in a model of Alzheimer's disease. *Aging Cell*, 12(2), 292–302.
- Alvarez, A., Cacabelos, R., Sanpedro, C., García-Fantini, M. & Aleixandre, M. (2007). Serum TNF- $\alpha$  levels are increased and correlate negatively with free IGF-I in Alzheimer disease. *Neurobiology of Aging*, 28(4), 533–6.
- Anderson, C. M., Bergher, J. P. & Swanson, R. A. (2004). ATP-induced ATP release from astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 88, 246–256.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P. & Haydon, P. G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in Neurosciences*, 22(5), 208–215.
- Ashpole, N. M., Chawla, A. R., Martin, M. P., Brustovetsky, T., Brustovetsky, N. & Hudmon, A. (2013). Loss of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in cortical astrocytes decreases glutamate uptake and induces neurotoxic release of ATP. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(20), 14599–14611.
- Bai, J. & Lipski, J. (2014). Involvement of TRPV4 channels in A $\beta$ 40-induced hippocampal cell death and astrocytic Ca<sup>2+</sup> signalling. *Neurotoxicology*, 41, 64–72.
- Beck, A., Nieden, R. Zur, Schneider, H. & Deitmer, J. W. (2004). Calcium release from intracellular stores in rodent astrocytes and neurons in situ. *Cell Calcium*, 35, 47–58.
- Bernardi, P. (1999). Mitochondrial Transport of Cations: Channels, Exchangers, and Permeability Transition. *Physiological Reviews*, 79(4), 1127–1155.
- Berridge, M. J. (2009). Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793(6), 933–940.
- Berridge, M. J. (2014). Calcium regulation of neural rhythms, memory and Alzheimer's disease. *J. Physiol.*, 592(2), 281–293.
- Berridge, M. J., Lipp, P. & Bootman, M. D. (2000). The Versatility and Universality of Calcium Signalling. *Nature Reviews*, 1, 11–21.

- Burnashev, N., Khodorova, A., Jonas, P., Helm, P. J., Wisden, W., Monyer, H., Seeburg, P. H. & Sakmann, B. (1992). Calcium-Permeable AMPA-Kainate Receptors in Fusiform Cerebellar Glial Cells. *Science*, 256(5063), 1566–1570.
- Bushong, E. a, Martone, M. E., Jones, Y. Z. & Ellisman, M. H. (2002). Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *The Journal of Neuroscience*, 22(1), 183–192.
- Carafoli, E. (2002). Calcium signaling : A tale for all seasons. *PNAS*, 99(3), 1115–1122.
- Carmignoto, G. & Haydon, P. G. (2012). Astrocyte calcium signaling and epilepsy. *Glia*, 60(8), 1227–33.
- Case, R. M., Eisner, D., Gurney, A., Jones, O., Muallem, S. & Verkhratsky, A. (2007). Evolution of calcium homeostasis : From birth of the first cell to an omnipresent signalling system. *Cell Calcium*, 42, 345–350.
- Clapham, D. E. (2007). Review Calcium Signaling. *Cell*, 131, 1047–1058.
- Colombo, J. a & Reisin, H. D. (2004). Interlaminar astroglia of the cerebral cortex: a marker of the primate brain. *Brain Research*, 1006(1), 126–131.
- Cornell-Bell, A. H., Finkbeiner, S. M., Cooper, M. S. & Smith, S. J. (1990). Glutamate Induces Calcium Waves in Cultured Astrocytes : Long-Range Glial Signaling. *Science*, 247(4941), 470–473.
- Csordás, G., Thomas, A. P. & Hajnóczsky, G. (1999). Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria. *The EMBO Journal*, 18(1), 96–108.
- D’Ascenzo, M., Vairano, M., Andreassi, C., Navarra, P., Azzena, G. B. & Grassi, G. (2004). Electrophysiological and Molecular Evidence of L-(Cav1), N-(Cav2.2), and R-(Cav2.3) Type Ca<sup>2+</sup> Channels in Rat Cortical Astrocytes. *Glia*, 45, 354–363.
- Emsley, J. G. & Macklis, J. D. (2006). Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS. *Neuron Glia Biol.*, 2(3), 175–186.
- Esposito, E., Impellizzeri, D., Mazzon, E., Paterniti, I. & Cuzzocrea, S. (2012). Neuroprotective activities of palmitoylethanolamide in an animal model of Parkinson’s disease. *PloS One*, 7(8), e41880.
- Feig, S. L. & Haberly, L. B. (2011). Surface-associated astrocytes, not endfeet, form the glia limitans in posterior piriform cortex and have a spatially distributed, not a domain, organization. *The Journal of Comparative Neurology*, 519(10), 1952–1969.
- Fellin, T., Gomez-Gonzalo, M., Gobbo, S., Carmignoto, G. & Haydon, P. G. (2006). Astrocytic glutamate is not necessary for the generation of epileptiform neuronal activity in hippocampal slices. *The Journal of Neuroscience*, 26(36), 9312–9322.
- Fellin, T., Pascual, O., Gobbo, S., Pozzan, T., Haydon, P. G. & Carmignoto, G. (2004). Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron*, 43(5), 729–743.

- Gibson, E. M., Purger, D., Mount, C. W., Goldstein, A. K., Lin, G. L., Wood, L. S., Inema, I., Miller, S. E., Bieri, G., Zuchero, J. B., Barres, B. A., Woo, P. J., Vogel, H. & Monje, M. (2014). Neuronal Activity Promotes Oligodendrogenesis and Adaptive Myelination in the Mammalian Brain. *Science*, 344(1252304), 1–12.
- Goldman, F., Yarowsky, P. J., Juhaszova, M., Krueger, B. K. & Blaustein, P. M. (1994). Sodium/Calcium Exchange in Rat Cortical Astrocytes. *The Journal of Neuroscience*, 14(10), 5834–5843.
- Golovina, V. A. (2005). Visualization of localized store-operated calcium entry in mouse astrocytes . Close proximity to the endoplasmic reticulum. *J. Physiol.*, 564(3), 737–749.
- Golovina, V. A. & Blaustein, M. P. (1997). Spatially and Functionally Distinct Ca<sup>2+</sup> Stores in Sarcoplasmic and Endoplasmic Reticulum. *Science*, 275, 1643–1648.
- Grimaldi, M., Maratos, M. & Verma, A. (2003). Transient Receptor Potential Channel Activation Causes a Novel Form of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> Oscillations and Is Not Involved in Capacitative Ca<sup>2+</sup> Entry in Glial Cells. *Journal of Neuroscience*, 23(11), 4737–4745.
- Grolla, A. A., Sim, J. A., Lim, D., Rodriguez, J. J., Genazzani, A. A. & Verkhratsky, A. (2013). Amyloid- $\beta$  and Alzheimer's disease type pathology differentially affects the calcium signalling toolkit in astrocytes from different brain regions. *Cell Death & Disease*, 4(5), 1–7.
- Guerini, D., Coletto, L. & Carafoli, E. (2005). Exporting calcium from cells. *Cell Calcium*, 38, 281–289.
- Halassa, M. M., Fellin, T. & Haydon, P. G. (2007). The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends in Molecular Medicine*, 13(2), 54–63.
- Halassa, M. M., Fellin, T., Takano, H., Dong, J.-H. & Haydon, P. G. (2007). Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *The Journal of Neuroscience*, 27(24), 6473–6477.
- Haughey, N. J. & Mattson, M. P. (2003). Alzheimer's Amyloid  $\beta$ -Peptide Enhances ATP/Gap Junction-Mediated Calcium-Wave Propagation in Astrocytes. *NeuroMolecular Medicine*, 3, 173–179.
- Heuser, K., Szokol, K. & Taubøll, E. (2014). The role of glial cells in epilepsy. *Tidsskrift for Den Norske Lægeforening*, 134(1), 37–41.
- Hirrlinger, J., Hülsmann, S. & Kirchhoff, F. (2004). Astroglial processes show spontaneous motility at active synaptic terminals in situ. *The European Journal of Neuroscience*, 20(8), 2235–2239.
- Holtzclaw, L. A., Pandhit, S., Bare, D. J., Mignery, G. A. & Russell, J. T. (2002). Astrocytes in Adult Rat Brain Express Type 2 Inositol 1,4,5-Triphosphate Receptors. *Glia*, 39, 69–84.
- Hua, X., Malarkey, E. B., Sunjara, V., Rosenwald, S. E., Li, W. & Parpura, V. (2004). Ca<sup>2+</sup>-Dependent Glutamate Release Involves Two Classes of Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Stores in Astrocytes. *Journal of Neuroscience Research*, 76, 86–97.
- Iadecola, C. & Nedergaard, M. (2007). Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nature Neuroscience*, 10(11), 1369–1376.

- Ichas, F., Jouaville, L. S. & Mazat, J. (1997). Mitochondria Are Excitable Organelles Capable of Generating and Conveying Franc. *Cell*, 89, 1145–1153.
- Illes, P., Verkhratsky, A., Burnstock, G. & Franke, H. (2011). P2X Receptors and Their Roles in Astroglia in the Central and Peripheral Nervous System Neuroscientist. *Neuroscience Update*, 18(5), 422–438.
- Innocenti, B., Parpura, V. & Haydon, P. G. (2000). Imaging Extracellular Waves of Glutamate during Calcium Signaling in Cultured Astrocytes. *The Journal of Neuroscience*, 20(5), 1800–1808.
- Jeremic, A., Jeftinija, K., Stevanovic, J., Glavaski, A. & Jeftinija, S. (2001). ATP stimulates calcium-dependent glutamate release from cultured astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 77, 664–675.
- Jiménez, A. J., Domínguez-Pinos, M.-D., Guerra, M. M., Fernández-Llebrez, P. & Pérez-Fígares, J.-M. (2014). Structure and function of the ependymal barrier and diseases associated with ependyma disruption. *Tissue Barriers*, 2, 1–14.
- Jou, M.-J. (2008). Pathophysiological and pharmacological implications of mitochondria-targeted reactive oxygen species generation in astrocytes. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(13-14), 1512–1526.
- Kawamata, H., Ng, S. K., Diaz, N., Burstein, S., Morel, L., Osgood, A., Sider, B., Higashimori, H., Haydon, P. G., Manfredi, G. & Yang, Y. (2014). Abnormal Intracellular Calcium Signaling and SNARE- Dependent Exocytosis Contributes to SOD1G93A Astrocyte- Mediated Toxicity in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *The Journal of Neuroscience*, 34(6), 2331–2348.
- Kimelberg, H. K. (2009). Astrocytes in (Patho)Physiology of the Nervous System. *Springer US*, 1–25.
- Kimelberg, H. K. (2010). Functions of Mature Mammalian Astrocytes: A Current View. *The Neuroscientist*, 16(1), 79–106.
- Kimelberg, H. K. & Nedergaard, M. (2010). Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. *Neurotherapeutics*, 7(4), 338–353.
- Kirischuk, S., Kettenmann, H. & Verkhratsky, A. (1997). Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger modulates kainate-triggered Ca<sup>2+</sup> signaling in Bergmann glial cells in situ. *FASEB J.*, 11, 566–572.
- Kofuji, P. & Newman, E. a. (2004). Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience*, 129(4), 1045–1056.
- Kriegstein, A. & Alvarez-Buylla, A. (2009). The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells. *Annu Rev Neurosci*, 32, 149–184.
- Kuga, N., Sasaki, T., Takahara, Y., Matsuki, N. & Ikegaya, Y. (2011). Large-Scale Calcium Waves Traveling through Astrocytic Networks In Vivo. *The Journal of Neuroscience*, 31(7), 2607–2614.
- Kuchibhotla, K. V, Lattarulo, C. R., Hyman, B. T. & Bacskaï, B. J. (2009). Synchronous Hyperactivity and Intercellular Calcium Waves in Astrocytes in Alzheimer Mice. *Science*, 323(27), 1211–1215.
- Lalo, U., Pankratov, Y., Kirchhoff, F., North, R. A. & Verkhratsky, A. (2006). NMDA receptors mediate neuron-to-glia signaling in mouse cortical astrocytes. *The Journal of Neuroscience*, 26(10), 2673–83.



- Lalo, U., Pankratov, Y., Parpura, V. & Verkhratsky, A. (2011). Ionotropic receptors in neuronal-astroglial signalling: what is the role of “excitable” molecules in non-excitable cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813(5), 992–1002.
- Lalo, U., Pankratov, Y., Wichert, S. P., Rossner, M. J., North, R. A., Kirchhoff, F. & Verkhratsky, A. (2008). P2X1 and P2X5 subunits form the functional P2X receptor in mouse cortical astrocytes. *The Journal of Neuroscience*, 28(21), 5473–5480.
- Latour, I., Hamid, J., Beedle, A. M., Zamponi, G. W. & MacVicar, B. A. (2003). Expression of Voltage-Gated Ca<sup>2+</sup> Channel Subtypes in Cultured Astrocytes. *Glia*, 41, 347–353.
- Lee, L., Kosuri, P. & Arancio, O. (2014). Picomolar Amyloid- $\beta$  Peptides Enhance Spontaneous Astrocyte Calcium Transients. *J. Alzheimers. Dis.*, 38(1), 49–62.
- Leis, J. a, Bekar, L. K. & Walz, W. (2005). Potassium homeostasis in the ischemic brain. *Glia*, 50(4), 407–416.
- Lim, D., Iyer, A., Ronco, V., Grolla, A. a, Canonico, P. L., Aronica, E. & Genazzani, A. a. (2013). Amyloid Beta deregulates astroglial mGluR5-mediated calcium signaling via calcineurin and Nf-kB. *Glia*, 61(7), 1134–45.
- Lin, H. A. I., Bhatia, R. & Lal, R. (2001). Amyloid  $\beta$  protein forms ion channels: implications for Alzheimer’s disease pathophysiology. *The FASEB Journal*, 15, 2433–2444.
- Liou, J., Kim, M. L., Heo, W. Do, Jones, J. T., Myers, J. W., James, E., Jr, F. & Meyer, T. (2005). STIM is a Ca<sup>2+</sup> sensor essential for Ca<sup>2+</sup>-store-depletion-triggered Ca<sup>2+</sup> influx. *Curr Biol.*, 15(13), 1235–1241.
- Liu, T., Clark, R. K., McDonnell, P. C., Young, P. R., White, R. F., Barone, F. C. & Feuerstein, G. Z. (1994). Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. *Stroke*, 25(7), 1481–1488.
- Luik, R. M. & Lewis, R. S. (2007). New insights into the molecular mechanisms of store-operated Ca<sup>2+</sup> + signaling in T cells. *Trends in Molecular Medicine*, 13(3), 103–107.
- Magistretti, P. J. (2009). Role of glutamate in neuron-glia metabolic coupling 1 – 4. *Am J Clin Nutr*, 90, 875–880.
- Malarkey, E. B., Ni, Y. & Parpura, V. (2008). Ca<sup>2+</sup> Entry Through TRPC1 Channels Contributes to Intracellular Ca<sup>2+</sup> Dynamics and Consequent Glutamate Release from Rat Astrocytes. *Glia*, 56, 821–835.
- Maruyama, T., Kanaji, T., Nakade, S., Kanno, T. & Mikoshiba, K. (1997). 2APB, 2-Aminoethoxydiphenyl Borate, a Membrane-Penetrable Modulator of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-Induced Ca<sup>2+</sup> Release. *J. Biochem.*, 122, 498–505.
- Mathiesen, C., Brazhe, A., Thomsen, K. & Lauritzen, M. (2013). Spontaneous calcium waves in Bergman glia increase with age and hypoxia and may reduce tissue oxygen. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 33(2), 161–169.

- Mathiisen, T. M., Lehre, K. P., Danbolt, N. C. & Ottersen, O. P. (2010). The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. *Glia*, 58(9), 1094–1103.
- Matyash, V. & Kettenmann, H. (2010). Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Research Reviews*, 63(1-2), 2–10.
- Meissner, G. (1984). Adenine Nucleotide Stimulation of  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  Release in Sarcoplasmic Reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, 259(4), 2365–2374.
- Minelli, A., Castaldo, P., Gobbi, P., Salucci, S., Magi, S. & Amoroso, S. (2007). Cellular and subcellular localization of  $\text{Na}^{+}$ – $\text{Ca}^{2+}$  exchanger protein isoforms, NCX1, NCX2, and NCX3 in cerebral cortex and hippocampus of adult rat. *Cell Calcium*, 41, 221–234.
- Nedergaard, M. (1994). Direct Signaling from Astrocytes to Neurons in Cultures of Mammalian Brain. *Science*, 263(5154), 1768–1771.
- Oberheim, N. A., Takano, T., Han, X., He, W., Lin, J. H. C., Xu, Q., Wyatt, J. D., Pilcher, W., Ojemann, J. G., Bruce, R., Goldman, S. A. & Nedergaard, M. (2009). Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J Neurosci.*, 29(10), 1–23.
- Ochiai, E. (1991). Why Calcium ? *Journal of Chemical Education*, 68(1), 10–12.
- Oikawa, H., Nakamichi, N., Kambe, Y., Ogura, M. & Yoneda, Y. (2005). An Increase in Intracellular Free Calcium Ions by Nicotinic Acetylcholine Receptors in a Single Cultured Rat Cortical Astrocyte. *Journal of Neuroscience Research*, 544, 535–544.
- Oseki, K. T., Monteforte, P. T., Pereira, G. J. S., Hirata, H., Ureshino, R. P., Bincoletto, C., Hsu, Y. & Smaili, S. S. (2014). Apoptosis induced by ABeta25-35 peptide is  $\text{Ca}^{2+}$ -IP3 signaling-dependent in murine astrocytes. *European Journal of Neuroscience*, 40, 2471–2478.
- Paluzzi, S., Alloisio, S., Zappettini, S., Milanese, M., Raiteri, L., Nobile, M. & Bonanno, G. (2007). Adult astroglia is competent for  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$  exchanger-operated exocytotic glutamate release triggered by mild depolarization. *Journal of Neuroscience*, 103, 1196–1207.
- Palygin, O., Lalo, U. & Pankratov, Y. (2011). Distinct pharmacological and functional properties of NMDA receptors in mouse cortical astrocytes. *British Journal of Pharmacology*, 163, 1755–1766.
- Palygin, O., Lalo, U., Verkhratsky, A. & Pankratov, Y. (2010). Ionotropic NMDA and P2X1/5 receptors mediate synaptically induced  $\text{Ca}^{2+}$  signalling in cortical astrocytes. *Cell Calcium*, 48(4), 225–231.
- Parpura, V., Basarsky, T. A., Liu, F., Jeftinija, K., Jeftinija, S. & Haydon, P. G. (1994). Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature*, 368(30), 744–747.
- Parpura, V., Grubišić, V. & Verkhratsky, A. (2011).  $\text{Ca}^{2+}$  sources for the exocytotic release of glutamate from astrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813(5), 984–991.
- Parri, H. R. & Crunelli, V. (2003). The Role of  $\text{Ca}^{2+}$  in The Generation of Spontaneous Astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  Oscillations. *Neuroscience*, 120, 979–992.

- Pascual, O., Ben Achour, S., Rostaing, P., Triller, A. & Bessis, A. (2012). Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(4), E197–E205.
- Pasti, L., Volterra, A., Pozzan, T. & Carmignoto, G. (1997). Intracellular Calcium Oscillations in Astrocytes: A Highly Plastic Bidirectional Form of Communication between Neurons and Astrocytes In Situ. *The Journal of Neuroscience*, 17(20), 7817–7830.
- Petravicz, J., Fiacco, T. A. & McCarthy, K. D. (2008). Loss of IP3R-Dependent Ca<sup>2+</sup> Increases in Hippocampal Astrocytes Does Not Affect Baseline CA1 Pyramidal Neuron Synaptic Activity. *J. Neurosci.*, 28(19), 4967–4973.
- Pizzo, P., Burgo, A., Pozzan, T. & Fasolato, C. (2001). Role of capacitative calcium entry on glutamate-induced calcium influx in type-I rat cortical astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 79, 98–109.
- Poloni, M., Facchetti, D., Mai, R., Micheli, A., Agnoletti, L., Francolini, G., Mora, G., Camana, C., Mazzini, L. & Tiziana, B. (2000). Circulating levels of tumour necrosis factor- $\alpha$  and its soluble receptors are increased in the blood of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters*, 287, 211–214.
- Ramsey, I. S., Delling, M. & Clapham, D. E. (2006). An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol*, 68(2), 619–647.
- Reyes, R. C. & Parpura, V. (2008). Mitochondria Modulate Ca<sup>2+</sup>-dependent Glutamate Release From Rat Cortical Astrocytes. *J. Neurosci.*, 28(39), 9682–9691.
- Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F. S., Fogarty, K. E., Lifshitz, L. M., Tuft, R. A. & Pozzan, T. (1998). Close Contacts with the Endoplasmic Reticulum as Determinants of Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Responses. *Science*, 280, 1763–1766.
- Rojas, H., Colina, C., Ramos, M., Benaim, G., Jaffe, E. H., Caputo, C. & Dipolo, R. (2007). Na<sup>+</sup> entry via glutamate transporter activates the reverse Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange and triggers Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in rat cerebellar Type-1 astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 100, 1188–1202.
- Rojas, H., Ramos, M., Benaim, G., Caputo, C. & DiPolo, R. (2008). The Activity of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Exchanger Largely Modulates the Ca<sup>2+</sup> i Signal Induced by Hypo-Osmotic Stress in Rat Cerebellar Astrocytes. The Effect of Osmolarity on Exchange Activity. *J. Physiol.*, 58(4), 277–290.
- Roos, J., Digregorio, P. J., Yeromin, A. V., Ohlsen, K., Lioudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J. A., Wagner, S. L., Cahalan, M. D., Velichelebi, G. & Stauderman, K. A. (2005). STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca<sup>2+</sup> channel function. *The Journal of Cell Biology*, 169(3), 435–445.
- Rovira, C., Arbez, N. & Mariani, J. (2002). A $\beta$  (25–35) and A $\beta$  (1–40) act on different calcium channels in CA1 hippocampal neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 296, 1317–1321.

- Sama, D. M. & Norris, C. M. (2013). Calcium dysregulation and neuroinflammation : Discrete and integrated mechanisms for age-related synaptic dysfunction. *Ageing Research Reviews*, 12(4), 982–995.
- Santello, M., Bezzi, P. & Volterra, A. (2011). TNF $\alpha$  controls glutamatergic gliotransmission in the hippocampal dentate gyrus. *Neuron*, 69(5), 988–1001.
- Streit, W. J. (2002). Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia*, 40(2), 133–139.
- Szalai, G., Krishnamurthy, R. & Hajnóczky, G. (1999). Apoptosis driven by IP 3 -linked mitochondrial calcium signals. *The EMBO Journal*, 18(22), 6349–6361.
- Takano, T., Tian, G.-F., Peng, W., Lou, N., Libionka, W., Han, X. & Nedergaard, M. (2006). Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nature Neuroscience*, 9(2), 260–267.
- Theodosis, D. T., Poulain, D. A. & Oliet, S. H. R. (2008). Activity-Dependent Structural and Functional Plasticity of Astrocyte-Neuron Interactions. *Physiol Rev*, 88, 983–1008.
- Tian, G., Azmi, H., Takano, T., Xu, Q., Peng, W., Oberheim, N., Lou, N., Zielke, R. & Kang, J. (2005). An astrocytic basis of epilepsy. *Nat. Med.*, 11(9), 973–981.
- Torres, A., Wang, F., Xu, Q., Fujita, T., Dobrowolski, R., Willecke, K., Takano, T. & Nedergaard, M. (2012). Extracellular Ca<sup>2+</sup> Acts as a Mediator of Communication from Neurons to Glia. *Sci Signal*, 5(208), 1–23.
- Torres-Platas, S. G., Hercher, C., Davoli, M. A., Maussion, G., Labonté, B., Turecki, G. & Mechawar, N. (2011). Astrocytic hypertrophy in anterior cingulate white matter of depressed suicides. *Neuropsychopharmacology*, 36(13), 2650–2658.
- Ullian, E. M., Sapperstein, S. K., Christopherson, K. S. & Barres, B. A. (2001). Control of Synapse Number by Glia. *Science*, 291, 657–661.
- Vaarmann, A., Gandhi, S. & Abramov, A. Y. (2010). Dopamine induces Ca<sup>2+</sup> signaling in astrocytes through reactive oxygen species generated by monoamine oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(32), 25018–23.
- Verkhatsky, A., Rodríguez, J. J. & Parpura, V. (2012). Calcium signalling in astroglia. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 353(1-2), 45–56.
- Wang, D. D. & Bordey, A. (2008). The astrocyte odyssey. *Progress in Neurobiology*, 86(4), 342–367.
- Watanabe, M., Toyama, Y. & Nishiyama, A. (2002). Differentiation of Proliferated NG2-Positive Glial Progenitor Cells in a Remyelinating Lesion. *Journal of Neuroscience Research*, 69, 826–836.
- Xu, J. H., Long, L., Tang, Y. C., Hu, H. T. & Tang, F. R. (2007). Cav1.2, Cav1.3, and Cav2.1 in the Mouse Hippocampus During and After Pilocarpine-Induced Status Epilepticus. *HIPPOCAMPUS*, 17, 235–251.
- Yaguchi, T. & Nishizaki, T. (2010). Extracellular High K<sup>+</sup> Stimulates Vesicular Glutamate Release From Astrocytes by Activating Voltage-Dependent Calcium Channels. *Cellular Physiology*, 225, 512–518.

- Yamaguchi, N., Xu, L., Pasek, D. A., Evans, K. E., Chen, S. R. W. & Meissner, G. (2005). Calmodulin Regulation and Identification of Calmodulin Binding Region of Type-3 Ryanodine Receptor Calcium Release Channel. *Biochemistry*, 44, 15074–15081.
- Young, S. Z., Platel, J., Nielsen, J. V., Jensen, N. A. & Bordey, A. (2010). GABA A increases calcium in subventricular zone astrocyte-like cells through L- and T-type voltage-gated calcium channels. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 4(8), 1–9.
- Yu, Z., Yu, P., Chen, H. & Geller, H. M. (2014). Targeted inhibition of KCa3.1 attenuates TGF- $\beta$ -induced reactive astrogliosis through the Smad2/3 signaling pathway. *Journal of Neurochemistry*, 130(1), 41–9.
- Zhang, S. L., Yeromin, A. V., Zhang, X. H., Yu, Y., Safrina, O., Penna, A., Roos, J., Stauderman, K. A. & Cahalan, M. D. (2006). Genome-wide RNAi screen of Ca<sup>2+</sup> influx identifies genes that regulate Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channel activity. *PNAS*, 103(24), 9357–9362.
- Zhu, X., Bergles, D. E. & Nishiyama, A. (2008). NG2 cells generate both oligodendrocytes and gray matter astrocytes. *Development*, 135, 145–157.
- Ilie L., 2012. Tesutul nervos. In: Blogger [online]. Poslední změna 10. 5. 2012. [Cit. 18. 8. 2014]. Dostupné z: <http://biolog-vasile.blogspot.cz/2012/05/tesutul-nervos.html>
- Verkhatsky A. & Butt A., 2013. Glial Physiology and Pathophysiology. John Wiley & Sons, First Edition.